

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

**Caracterización molecular de bacterias degradadoras de
pentaeritritol tetranitrato (PETN) aisladas de ambientes
mineros y evaluación de su eficiencia de degradación**

TESIS

Para optar al Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo

AUTOR

Yerson Durán Ramirez

ASESOR

Pablo Ramírez Roca

Lima – Perú

2013

DEDICATORIA

A mi abuelo Alfonso Durán

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Norma y Alberto por su amor, comprensión, apoyo en todo momento y valiosos consejos.

A mis hermanos Carmen Rosa y Gary por su cariño y apoyo durante estos años de estudio.

A mi tíos y tías Ela, Rubén, Norma, Norberta, Lili y primos que hicieron posible seguir este camino y por todos los momentos compartidos.

Al profesor Pablo Ramírez por su valiosa guía y apoyo durante estos años como alumno y tesista.

A las profesoras Débora Alvarado y Ruth García por su confianza depositada en mí.

A todos mis compañeros de mi promoción, con quienes conviví cinco años provechosos de mi vida; y en especial a Jennifer Herencia, mi compañera incondicional que me alentó cada día durante el desarrollo de este proyecto.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología por su amistad y consejos.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN. Ácido desoxirribonucleico

ANFO. Ammonium Nitrate - Fuel Oil por sus siglas en inglés

AOAC. Association of Official Analytical Chemists por sus siglas en inglés

dNTP. Desoxinucleótidos trifosfatos

EPA. Environmental Protection Agency por sus siglas en inglés

FMN. Flavin mononucleótido

HMX. High Melting Explosive por sus siglas en inglés

HPLC. High-Performance Liquid Chromatography por sus siglas en inglés

NADPH. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase por sus siglas en inglés

NTG. Nitroglicerina

PCR. Polymerase Chain Reaction por sus siglas en inglés

PETN. Pentaeritritol tetranitrato

RDX. Research Department Explosive por sus siglas en inglés

RFLP. Restriction Fragment Length Polymorphism por sus siglas en inglés

TNP. Trinitrofenol

TNT. Trinitrotolueno

TSA. Tripticasa Soya Agar

UN. United Nations por sus siglas en inglés

ÍNDICE GENERAL	pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Explosivos.....	3
2.2 Pentaeritritol tetranitrato (PETN).....	5
2.3 Tratamientos para la remediación de explosivos.....	8
2.3.1 Tratamiento fisicoquímico.....	8
2.3.2 Tratamiento biológico.....	9
2.4 Biodegradación de PETN.....	9
2.5 Métodos empleados para la cuantificación de PETN.....	12
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	14
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
4.1 MATERIALES.....	15
4.2 METODOLOGÍA.....	17
4.2.1 Selección de cepas.....	17
4.2.2 Caracterización molecular y fenotípica de las cepas seleccionadas...	18
4.2.3 Cinética de degradación de PETN por las cepas seleccionadas.....	20
4.2.5 Determinación de la actividad PETN reductasa.....	22
5. RESULTADOS.....	24
5.1 Cepas degradadoras de PETN.....	24
5.2 Amplificación y secuenciación del gen rRNA 16S.....	27
5.3 Cepas identificadas mediante análisis del gen rRNA 16S.....	27

	pag.
5.4 Caracterización fenotípica de las cepas identificadas mediante análisis del gen rRNA 16S.....	31
5.5 Cinética de degradación de PETN.....	32
5.6 Actividad PETN reductasa.....	36
6. DISCUSIÓN.....	38
6.1 Identificación molecular y fenotípica de las cepas degradadoras de PETN.....	38
6.2 Cepas degradadoras de PETN.....	40
6.3 Evaluación de la cinética de degradación de PETN.....	41
6.4 Evaluación de la actividad PETN reductasa.....	44
7. CONCLUSIONES.....	46
8. RECOMENDACIONES.....	47
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
ANEXO 1. ALINEAMIENTO DEL GEN rRNA 16S DE LA CEPA J8A2.....	57
ANEXO 2. ALINEAMIENTO DEL GEN rRNA 16S DE LA CEPA M1B.....	59
ANEXO 3. CURVA ESTÁNDAR DE SEROALBÚMINA BOVINA.....	60
ANEXO 4. CURVA ESTÁNDAR DE NITRITO DE SODIO.....	61
ANEXO 5. CURVA ESTÁNDAR DE NADPH.....	62
ANEXO 6. COLONIAS DE LAS CEPAS J8A2 Y M1B EN AGAR MÍNIMO P.....	63
ANEXO 7. COLONIAS DE LAS CEPAS J8A2 Y M1B EN AGAR TSA.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

pág.

TABLA 1. Relación de explosivos del grupo A y D.....4

TABLA 2. Tratamiento fisicoquímico de explosivos.....8

TABLA 3. Tratamiento biológico de explosivos.....10

TABLA 4. Crecimiento en caldo PETN de cepas aisladas de ambientes mineros.....26

TABLA 5. Efecto del succinato y glucosa como fuente de carbono en el crecimiento en
caldo PETN.....27

ÍNDICE DE FIGURAS

pág.

Figura 1. Molécula de PETN.....	5
Figura 2. Metabolitos de la degradación de PETN por <i>Enterobacter cloacae</i> PB2.....	12
Figura 3. Ruta de biodegradación de PETN por <i>Enterobacter cloacae</i> PB2.....	12
Figura 4. Amplicones de 500 pb del gen rRNA 16S de las cepas J8A2 y M1B.....	28
Figura 5. Árbol Filogenético de <i>Bacillus</i> sp. J8A2.....	29
Figura 6. Árbol Filogenético de <i>Enterobacter</i> sp. M1B.....	31
Figura 7. Efecto del Tween 80 (0.1%) en la degradación de PETN por <i>Bacillus</i> sp. J8A2.....	33
Figura 8. Cinética de degradación de PETN por <i>Enterobacter</i> sp. M1B.....	35
Figura 9. Cinética de degradación de PETN por <i>Bacillus</i> sp. J8A2.....	35
Figura 10. Cultivos de <i>Bacillus</i> sp. J8A2 y <i>Enterobacter</i> sp. M1B en caldo PETN modificado.....	36

RESUMEN

Los explosivos son considerados contaminantes por sus características xenobióticas y constituyen un riesgo para la salud porque algunos son tóxicos y carcinogénicos. Entre los más energéticos y recalcitrantes está el pentaeritritol tetranitrato (PETN) por sus enlaces éster de difícil degradación. Dado que este explosivo es ampliamente usado en la explotación minera, petrolera y en otras actividades en el Perú, en el presente estudio se evaluó la capacidad degradativa de PETN por bacterias aisladas de ambientes mineros con la perspectiva de desarrollar técnicas de mitigación de la contaminación y riesgo por explosivos.

Se identificaron las cepas J8A2 y M1B como *Bacillus* sp. y *Enterobacter* sp., respectivamente, las cuales demostraron la mayor eficiencia de degradación de PETN. En la cinética de degradación se obtuvo una velocidad específica de crecimiento de 0.057 h^{-1} para J8A2 y 0.042 h^{-1} para M1B, y una velocidad específica de degradación de $0.72\text{ mmol de PETN/g de proteína.h}$ y $1.16\text{ mmol de PETN/g de proteína.h}$, respectivamente. Sin embargo, el rendimiento por sustrato de J8A2 fue de $39.7 \pm 2.1\text{ g de proteína/mol de PETN}$ y de M1B $21.56 \pm 1.5\text{ g de proteína/mol de PETN}$. Además, el extracto crudo de la cepa J8A2 mostró una actividad específica (U) de $1.03\text{ mmol de PETN/h}$ y una actividad específica por proteína (U/g) de $138.6\text{ mmol de PETN/g.h}$.

En conclusión, estos resultados demuestran la presencia de bacterias degradadoras de PETN en ambientes mineros con potencial para ser empleadas en procesos de biorremediación.

Palabras clave: Pentaeritritol tetranitrato, contaminación, minería, biodegradación, *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp.

ABSTRACT

Explosives are considered pollutants for their xenobiotic characteristics. They constitute a health hazard because some of them are toxic and carcinogenic. Pentaerythritol tetranitrate (PETN) is included among the most energetic and xenobiotic explosive for its ester bonds that are difficult to degrade. As this explosive is widely used in mining, oil and other activities in Peru, in the present study we evaluated PETN degradation capacity of bacterial strains isolated from mining environments to develop techniques to mitigate pollution and explosives risk.

J8A2 and M1B strains were identified as *Bacillus* sp. and *Enterobacter* sp. respectively, and demonstrated a great PETN degradation efficiency. Degradation kinetics results showed specific growth rate of 0.057 h^{-1} for J8A2 and 0.042 h^{-1} for M1B, and specific rate of PETN degradation of $0.72\text{ mmol of PETN/g of protein.h}$ and $1.16\text{ mmol of PETN/g of protein.h}$, respectively. However, the growth yield of J8A2 was $39.7 \pm 2.1\text{ g of protein/mol of PETN}$ and the growth yield of M1B was $21.56 \pm 1.5\text{ g of protein/mol of PETN}$. Furthermore, crude extract of J8A2 strain showed a specific activity (U) of $1.03\text{ mmol of PETN/h}$ and a specific activity per protein (U/g) of $138.6\text{ mmol of PETN/g.h}$.

In conclusion, these findings demonstrated the presence of PETN degrading bacteria in mining environments with potential to be applied in bioremediation processes.

Keywords: Pentaerythritol tetranitrate, contamination, mining, biodegradation, *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp.

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación por explosivos es una preocupación global en los lugares donde éstos se producen, almacenan, y sobretodo donde se emplean (Binks *et al.*, 1996; French *et al.*, 1998; Ibeanusi *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2012) porque no son comunes en el ambiente y son recalcitrantes. Entre los explosivos más energéticos está el pentaeritritol tetranitrato (PETN), el cual se sintetiza mediante la nitrificación de derivados de alcoholes formando enlaces ésteres de difícil biodegradación (White *et al.*, 1996). Además, su estabilidad en el ambiente a 30 °C expresado en vida media extrapola un valor de 12 millones de años (Foltz, 2009).

El PETN es un detonante que no reacciona por movimiento brusco o la ignición a presión atmosférica normal, sino que es más sensible a la fricción y a los golpes que otros explosivos como el trinitrotolueno (TNT) y el tetril (Jaw y Lee, 2008). Además, la reactividad del PETN no está asegurada por sus características químicas, por lo que algunos dispositivos explosivos en la industria minera o petrolera pueden no explotar por problemas técnicos y ser un riesgo para el ambiente y las personas (Nyanhongo *et al.*, 2008).

Las características xenobióticas y el riesgo para la salud del hombre y el ambiente que predispone la contaminación por PETN fue contemplado por el Convenio de Estocolmo firmado por el Perú, consciente que este instrumento internacional deberá proteger al ambiente y al hombre de los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP's) (SINIA, 2007).

Asimismo, la industria nacional productora de explosivos en nuestro país afirma su compromiso, a través de su misión y política, en brindar productos con seguridad, calidad y respeto al medio ambiente; así como prevenir lesiones y enfermedades ocupacionales (FAMESA S.A.C., 2010; EXSA S.A., 2008).

En respuesta a este problema de carácter global se ha estudiado microorganismos degradadores de PETN como *Enterobacter cloacae* PB2 y *Agrobacterium radiobacter*, los cuales son capaces de degradar otros explosivos como el TNT y sus derivados (French *et al.*, 1998) que han sido reportados como carcinogénicos (Esteve-Núñez *et al.*, 2001). Es así que microorganismos capaces de degradar ambos compuestos serían los más efectivos durante el empleo del pentolito (mezcla de TNT y PETN), cuyo uso es común en nuestro país cuando se emplea ANFO (mezcla de nitrato de amonio y combustible) para voladuras (Estudios mineros, 2011; EXSA, 2008).

En este contexto, en el presente trabajo de investigación se realizó la selección de bacterias degradadoras de PETN aisladas de ambientes mineros, su identificación molecular y determinación de la eficiencia de degradación, con la perspectiva de atender el desarrollo de técnicas de control de contaminación y riesgos por explosivos en el Perú.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Explosivos

2.1.1 Generalidades

Los explosivos son productos químicos que se pueden formular por la mezcla de una o más sustancias en estado sólido o líquido que por temperatura o fricción reaccionan muy rápido descomponiéndose en sustancias más estables, y a la vez liberando calor y gases en el ambiente que provocan una elevada presión a alta temperatura que genera la explosión.

Los explosivos se diferencian en su velocidad de detonación, por lo que se les clasifica de manera general en explosivos rápidos, lentos e incendiarios. Los explosivos lentos tienen una velocidad de detonación de 400 metros por segundo, entre estos están las bombas a base de petróleo y pólvora. En cambio, los explosivos rápidos tienen una velocidad de detonación de 1,000 a 8,500 metros por segundo y crean un efecto ráfaga con una onda de choque muy rápida acompañado de una expansión de gases a alta presión y temperatura, entre estos están los explosivos nitrificados como el TNT, PETN, RDX, HMX y tetril. Los explosivos incendiarios están compuestos de napalm (gasolina gelatinosa), magnesio, termita (mezcla de metales oxidados y reducidos) o zirconio, que sólo tienen un efecto incendiario (Global security, 2011; García, 2011, EPA, 2005).

2.1.2 Clasificación

Los explosivos se clasifican bajo el sistema UN (Naciones Unidas por sus siglas en inglés) en trece grupos según las características de su composición, fácil ignición y sensibilidad a la detonación. Entre estos, los más representativos se encuentran en el Grupo A de explosivos primarios o iniciadores y Grupo D de explosivos de mayor energía y contenidos en dispositivos (Tabla 1).

TABLA 1. Relación de explosivos del grupo A y D*

Grupo	Explosivo
A Explosivos primarios o iniciadores	CL-20 (Hexanitrohexaazaisowurtzitano) seco
	HMX (Ciclotetrametileno de tetranitramina) seco
	Nitrocelulosa seco
	PETN (Pentaeritritol tetranitrato) seco
	RDX (Ciclotrimetileno de trinitramina) seco
D Explosivos rápidos o de alta energía	Picrato de Amonio
	Baratol
	CL-20 (Hexanitrohexaazaisowurtzitano) húmedo
	GAP (Polímero de glicerol azida)
	Pentolito (Mezcla de PETN y TNT)
	PETN (Pentaeritritol tetranitrato) húmedo
	RDX (Ciclotrimetileno de trinitramina) húmedo
	Tetril
	TNT (Trinitrotolueno)

*Adaptado de Global Security (2011).

2.2 Pentaeritritol tetranitrato (PETN)

2.2.1 Características

El PETN se sintetiza a partir de la nitrificación de pentaeritritol con ácido nítrico concentrado (98%) y usando ácido sulfúrico como catalizador, lo cual genera subproductos sulfonados inestables, el PETN precipita y es filtrado, neutralizado y lavado con agua para finalmente ser recrystalizado en acetona (White *et al.*, 1996; Foltz, 2009). La estructura química obtenida (Figura 1) lo clasifica dentro de los explosivos de ésteres de nitrato junto con la nitrocelulosa, los cuales son considerados de difícil biodegradación.

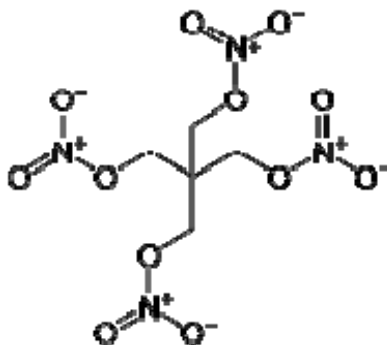


Figura 1. Molécula de PETN en disolución compuesta por cinco átomos de carbono centrales y cuatro residuos de nitrato unidos por enlaces éster a los átomos de carbono (Foltz, 2009).

El PETN ha sido designado con el código UN 150 y clasificado de riesgo 1.1D dentro de los explosivos en masa y de mayor energía (Global security, 2011). Presenta las siguientes características según USA-CHPPM (2001) y Foltz (2009):

- Cristales translúcidos a blancos.
- Peso molecular: 316.15 g/mol.
- Superficie específica: entre 5,000 a 30,000 cm²/g.
- Punto de fusión: 140 °C.
- Punto de ebullición: 180 °C pero se descompone a partir de los 150 °C.
- Autoignición: a partir de los 190 °C.
- Solubilización en agua: 43 mg/L.

2.2.2 Importancia industrial

El pentolito, preparado por la mezcla de PETN y TNT (1:1), es usado con fines militares, civiles e industriales tales como la minería, exploración petrolera, demoliciones y otros. Además, se emplea como detonador de armas nucleares (Global Security, 2011).

En adición, el pentolito y el ANFO (mezcla de nitrato de amonio y petróleo diesel) son ampliamente usados en la minería a cielo abierto o canteras (Estudios mineros, 2011) representada en nuestro país por las empresas mineras con las mayores utilidades registradas en los últimos años (ProInversion, 2007), lo cual indica un uso extensivo de los explosivos mencionados que deberían ser considerados como fuente de contaminación y riesgo para la población.

2.2.3 Importancia médica

El PETN es empleado como vasodilatador para tratar la hipertensión o la *angina pectoris*, pero exposiciones repetidas a esta sustancia pueden provocar resistencia en el hombre y a la larga una dependencia del cuerpo (USA-CHPPM, 2001), lo cual genera una enfermedad ocupacional llamada *Monday-morning death*, ya que los efectos se observan luego de cinco días de exposición continua seguido de dos días sin exposición (Quinn *et al.*, 2009).

Estudios sobre la toxicidad del PETN en animales han mostrado, generalmente, efectos como hipotensión, incremento de la tasa de respiración, incremento de peso del cerebro y el hígado y ligera disminución de peso entre 2%-9% de incidencia (USA-CHPPM, 2001; Quinn *et al.*, 2009). En humanos se ha presentado algunos casos de disnea, dermatitis y convulsiones (Kośmicki *et al.*, 2005).

Hasta la fecha no se ha llevado a cabo estudios ecotoxicológicos del PETN en aves, anfibios ni reptiles, y tampoco se ha estudiado la toxicidad de los catabolitos del PETN producidos por acción de los microorganismos.

Por otro lado, estudios recientes muestran que el PETN actúa como un cardioprotector en ratones induciendo la expresión de genes relacionados con esta característica, a diferencia de la nitroglicerina (NTG) que indujo genes considerados cardiotóxicos (Pautz *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado que el PETN no causa la inactivación del aldehído deshidrogenasa mitocondrial (ALDH2), importante en la bioconversión de drogas contra la angina, no induciendo así resistencia vascular en comparación con la NTG que si inactivó la ALDH2 (Griesberger *et al.*, 2011).

2.3 Tratamientos para la remediación de explosivos

2.3.1 Tratamiento fisicoquímico

Los tratamientos fisicoquímicos más reportados son la incineración y la detonación, y son utilizados para destruir grandes cantidades de explosivos (Tabla 2). Así mismo, sirven para el manejo de explosivos obsoletos, incautados y explosivos que son enterrados bajo tierra y que en algunas ocasiones no detonan (García, 2011). Por otro lado, la remediación química y la oxidación por aire húmedo (Tabla 2) son más empleados en la remediación de cuerpos de agua subterránea y subsuelos (EPA, 2005).

TABLA 2. Tratamiento fisicoquímico de explosivos*

Tratamiento	Ventajas	Desventajas
Incineración a campo abierto	Bajo costo Eficiente	Riesgo del personal y de la población Ruido Material particulado
Incineración en horno rotatorio	Eficiente Aplicado a diversos sustratos contaminados (incluyendo los húmedos)	Costoso No transportable Subproductos peligrosos y alergénicos
Detonación a campo abierto	Bajo costo Eficiente Menos material particulado	Riesgo del personal y de la población Ruido
Detonación en cámara	Reduce el ruido y las emisiones Transportables	Costoso
Oxidación por aire húmedo	Muy efectivo en tratamiento de RDX	Costoso Producción de gases y subproductos peligrosos.
Remediación química	Bajo costo Tratamiento de agua subterránea	Riesgo del personal y de la población
Lavado de suelo	Bajo costo	Posterior tratamiento del agua empleada

*Adaptado de García (2011) y EPA (2005).

2.3.2 Tratamiento biológico

Los tratamientos biológicos son conocidos por el menor riesgo al personal y la población, así como menor generación de subproductos tóxicos emitidos al ambiente (Tabla 3). Dada la ubicuidad de los microorganismos y su capacidad de adaptación, están logrando desarrollar métodos más amigables para el ambiente (García, 2011).

Asimismo, se han registrado avances en disminuir aún más los riesgos de contaminación. Una forma es limitando la proliferación de los microorganismos mediante el empleo de microorganismos genéticamente modificados (GEMs por sus siglas en inglés) que contienen genes suicidas, los cuales impiden su supervivencia luego de haber cumplido su objetivo; ahora estos organismos son más conocidos como microorganismos suicidas genéticamente modificados (SGEMs por sus siglas en inglés) (Paul *et al.*, 2005).

2.4 Biodegradación de PETN

La biodegradación de PETN se ha reportado en algunos estudios con *Enterobacter cloacae* PB2 y *Agrobacterium radiobacter* (Binks *et al.*, 1996; White *et al.*, 1996). En ambos casos, dichas cepas fueron aisladas de lodos residuales de plantas de tratamiento, y el PETN reemplazó los requerimientos de compuestos nitrogenados en el medio de cultivo. La capacidad de degradación de *A. radiobacter* fue de 0,1 mM de PETN por 1,5 horas y de *E. cloacae* PB2 fue de 1,03 mM de PETN por gramo de proteína por hora, mostrando éste último un mayor rendimiento. En general, la actividad enzimática sobre PETN puede denominarse nitrato éster reductasa (Foltz, 2009).

TABLA 3. Tratamiento biológico de explosivos*

Tratamiento	Ventajas	Desventajas
Compostaje	Bajo costo Efectivo	Tiempo prolongado de acción No efectivo en altas concentraciones de explosivo
Lodos activados	Más efectivo que otro tratamiento biológico Efectivo en suelos arcillosos	Relativamente costoso por los procesos de control, operación y mantenimiento
Biorremediación (Bioaugmentación)	Empleo de microorganismos nativos Efectivo y de bajo costo	Generalmente no es efectivo en suelos arcillosos Dificultad para tratar compuestos clorinados
Fitorremediación	Producción de enzimas microbianas por plantas Incremento de porcentajes de remoción	Relativamente costoso por los procesos de control y mantenimiento

*Adaptado de García (2011) y EPA (2005).

En estudios posteriores se demostró la capacidad de la enzima PETN reductasa, aislada y caracterizada de *E. cloacae* PB2 (French *et al.*, 1996), de degradar el explosivo 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) hasta su correspondiente complejo Meisenheimer-dihidrogenado y la posterior liberación de nitritos (French *et al.*, 1999). Además, se determinó la preferencia del cofactor NADPH por la PETN reductasa y la degradación de explosivo glicerol trinitrato (GTN) con un rendimiento diecinueve veces mayor que el mostrado con el TNT (Williams *et al.*, 2004).

En *E. cloacae* PB2 se postula la existencia de la vía degradativa del PETN con tres subproductos (Figura 2) identificados como 2,2bis[(nitrooxi) metil] -1,3-propanodiol) o pentaeritritol dinitrato (metabolito 1), 3-hidroxi-2,2bis [(nitrooxi)metil]propanal (metabolito 2) y 2,2-bis[(nitrooxi) metil]propanodial (metabolito 3). Además, se observó que los dos últimos se encontraron en bajas concentraciones y que la oxidación de NADPH ocurría en la misma proporción a la concentración de los nitritos liberados, por ello se postuló que la PETN reductasa era responsable de la vía degradativa representada en la Figura 3.

Las capacidades metabólicas de *E. cloacae* PB2 y *A. radiobacter* para degradar diversos tipos de explosivos no han mostrado eficiencia para remediar ambientes contaminados, por esta razón los genes que codifican la PETN reductasa de *E. cloacae* PB2 fueron clonados en plantas de *Nicotiana tabacum* (French *et al.*, 1999), con fines de fitorremediación.

Por otro lado, recientemente se ha reportado un estudio de degradación de TNT y PETN por consorcios microbianos aislados de suelos impactados por explosivos en el cual se evaluó la dinámica de la comunidad microbiana en un medio mínimo suplementado con TNT y PETN a una concentración final de 150 mg/L cada uno (García, 2011). Se determinó que durante los dos primeros subcultivos se produjeron niveles de hasta $35,2 \pm 11,4$ mg/l de aminodinitrotolueno (amDNTs) a partir de TNT, que pudo haber limitado la degradación de PETN. Con respecto al PETN, los consorcios no mostraron una degradación progresiva a través de los subcultivos ya que variaban desde 10% a 80% de reducción de PETN entre subcultivos. Finalmente, a partir de estos consorcios se logró identificar mediante RFLP a los géneros como *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Cupriavidus* y *Comamonas* (García, 2011); sin embargo, no se logró determinar si alguno de estos estaba involucrado directamente con la degradación del PETN.

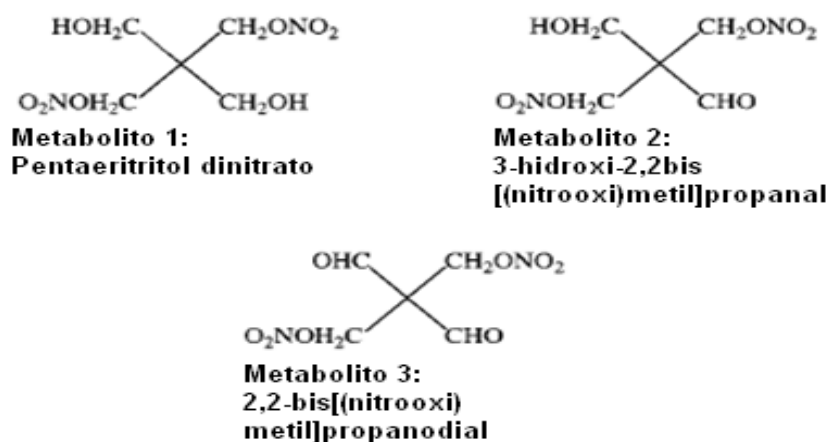


Figura 2. Metabolitos de la degradación de PETN por *Enterobacter cloacae* PB2. Adaptado de French *et al.* (1996).

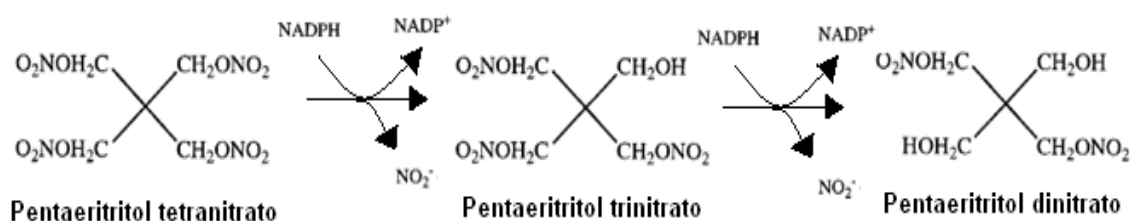


Figura 3. Ruta de biodegradación de PETN por *Enterobacter cloacae* PB2. Adaptado de French *et al.* (1996).

2.5 Métodos empleados para la cuantificación de PETN

2.5.1 Método de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Basado en el método EPA 8330B, éste recomienda su uso para la cuantificación de PETN y otros explosivos en medio acuoso. Se emplean columnas específicas de exclusión molecular y disolventes de grado molecular como el acetonitrilo. Posee alto

rendimiento, sin embargo, se recomienda emplear la espectrometría de masas como análisis confirmatorio. Además, es un método costoso y presenta como principal limitación la baja solubilidad del PETN (White *et al.*, 1996; García, 2011).

2.5.2 Método espectrofotométrico

Basado en el método oficial de la AOAC 964.25 (2002) aplicado a la cuantificación de PETN en medicamentos. Éste emplea ácido fenoldisulfónico para hidrolizar el PETN y formar ácido nítrico, luego el nitrito reacciona con el ácido fenoldisulfónico para producir nitrofenoldisulfonato en presencia de amonio que finalmente desarrolla una coloración amarilla con mayor absorbancia a 408 nm. La detección es en medio acuoso por lo que se consideró apropiado para ser adaptado en el presente trabajo de investigación. Su principal limitación, al igual que en el HPLC, es la baja solubilidad del PETN y por lo tanto su distribución no homogénea. Además, es un método poco costoso y de referencia internacional.

2.5.3 Método de detección de nitritos

La finalidad es detectar la concentración de nitritos en el medio acuoso mediante el método de Griess, éste ha permitido determinar el rendimiento de degradación y el consumo del PETN en relación indirecta con la concentración de nitritos liberados cuando se evalúa la actividad enzimática (Binks *et al.*, 1996).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Existen bacterias que degradan PETN en aguas tratadas, aguas y suelos superficiales de ambientes mineros dado que dicho explosivo es utilizado para la explotación minera.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

Caracterizar molecularmente las cepas bacterianas con mayor eficiencia de degradación de PETN aisladas de aguas tratadas, aguas y suelos superficiales de ambientes mineros.

3.2.2 Objetivos específicos

- Seleccionar bacterias degradadoras de PETN procedentes de ambientes mineros.
- Identificar las cepas con mayor eficiencia de degradación de PETN mediante análisis del gen rRNA16S.
- Evaluar la cinética de degradación de PETN de las cepas seleccionadas.
- Evaluar la actividad PETN reductasa de las cepas seleccionadas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 Material biológico:

Se contó con 19 cepas bacterianas aisladas de aguas tratadas, aguas y suelos superficiales de ambientes mineros de las regiones La Libertad, Junín y Lima proporcionadas por Mestas-Rodríguez *et al.* (2010) y del cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Dichas cepas fueron aisladas con el objetivo de degradar tiocianato por lo que se empleó un medio basal más tiocianato como única fuente de nitrógeno (Kanagawa y Mikami, 1995).

4.1.2 Material químico

Explosivo. El PETN de una pureza al 99% fue proporcionado por una industria nacional dedicada a la fabricación de dispositivos explosivos. Dicho explosivo se disolvió en acetona pura a una concentración final de 120 mg/mL.

Compuestos químicos. KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , NaCl , glucosa, sacarosa, succinato, glicerol, NH_4NO_3 , ácido acético glacial, ácido fenoldisulfónico, hidróxido de amonio, cianuro férrico, NADPH, metosulfato de fenazina, sulfanilamida, borato de sodio, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, EDTA, agarosa, bis-tris propano, tris base, azul de bromofenol, isopropanol, etanol,

Tween 80, acetona, agua ultrapura (grado molecular). Todos los reactivos son de grado analítico y fueron adquiridos de las compañías Merck®, Sigma-Aldrich® y Promega®.

4.1.4 Material de biología molecular

Iniciadores, marcadores y enzimas. Secuencias de oligonucleótidos iniciadores universales (Abanto, 2008): 27F (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) y 536R (GWA TTA CCG CGG CKG CTG) sintetizados por Invitrogen® para la amplificación parcial del gen rRNA 16S de bacteria, marcador molecular DNA Ladder (Promega®), KOD HOT start DNA polimerasa (Novagen®), lisozima (Sigma-Aldrich®).

Programas bioinformáticos

- **BlastN** versión 2.0 (Altschul *et al.*, 1990) para determinar la correspondencia de las secuencias obtenidas con las de la base de datos del GenBank/EMBL/DDBJ.
- **BioEdit** versión 7.1.3 (Hall *et al.*, 1999), para el alineamiento y edición de las secuencias del gen rRNA 16S.
- **Mega** versión 5.0 (Kumar *et al.*, 2008) para inferir el árbol filogenético de las cepas degradadoras de PETN con las respectivas secuencias del gen rRNA 16S.

4.1.5 Equipos. Micropipetas Eppendorf®, microcentrífuga MIKRO® 20, potenciómetro HANNA® Instruments pH210, agitador rotatorio IKA® KS 260, refrigeradora y congeladora Bosch®, espectrofotómetro UNICO® UV-2100, microscopio BOECO®, vórtex, cámara de electroforesis Biometra®, transiluminador Biometra® TI, cabina de flujo laminar Nuaire®, termociclador Minicycler®.

4.2 METODOLOGÍA

4.2.1 Selección de cepas

Las cepas puras procedentes de ambientes mineros fueron cultivadas durante 12-16 horas en caldo TSB (compuesto por g/L: caseína 17, glucosa 10, peptona de soya 3, NaCl 5 y K_2HPO_4 2.5) a 28 °C, luego se centrifugó 1.5 mL de cada cultivo a 4500 rpm por 5 min y se resuspendió el *pellet* en 1 mL de solución salina al 0.85% y se centrifugó a 4500 rpm por 5 min, finalmente el *pellet* se resuspendió en 1 mL de solución salina.

A partir de la suspensión obtenida se inoculó al 0.5% en caldo PETN (Binks *et al.*, 1996; White *et al.*, 1996) el cual está compuesto por (g/L): K_2HPO_4 3.5, KH_2PO_4 1.5, $MgSO_4$ 0.124, NaCl 0.5, glucosa 10, PETN 0.316 como única fuente de nitrógeno y 0.73 mL/L de glicerol, el pH fue ajustado a 7.02. Además se adicionó 1 mL por cada litro de medio de la solución de trazas (White *et al.*, 1996) compuesto por (g/L): $Na_2B_4O_7$ 0.57, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.24, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.04, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.06, $MnSO_4$ 0.03, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.31, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.03. Se incubó a 28 °C y 200 rpm por 7 días y se realizaron 2 subcultivos en las mismas condiciones.

Al cabo de los 7 días de cultivo se midió el crecimiento por densidad óptica a 600 nm (DO_{600}), luego del tercer subcultivo se verificó su pureza en placas de agar TSA (Trypticase Soya Agar) y en placas de agar mínimo P compuesto por (g/L): K_2HPO_4 3.5, KH_2PO_4 1.5, $MgSO_4$ 0.124, NaCl 0.5, glucosa 10, NH_4NO_3 0.24 y agar-agar al 1.5%, el pH fue ajustado a 7.02. Finalmente, las cepas que presentaron mayor densidad óptica

(DO₆₀₀) fueron seleccionadas para evaluar la preferencia de fuente de carbono y la degradación del PETN por espectrofotometría.

Se determinó la preferencia de fuente de carbono entre glucosa y succinato, basado en el reporte de Park *et al.* (2003). En éste, la glucosa, succinato, piruvato y glicerol demostraron ser fuentes de carbono con similar producción de biomasa cuando *Pseudomonas putida* utiliza TNT como única fuente de nitrógeno. Con este fin la cepas seleccionadas fueron sembradas al 0.5% por duplicado en caldo PETN con glucosa o succinato como únicas fuentes de carbono e incubadas a 200 rpm y 28 °C durante dos subcultivos de 7 días cada uno. El caldo PETN con succinato estaba compuesto por (g/L): K₂HPO₄ 1.68, MgSO₄ 0.124, NaCl 0.5, succinato 6.80, KOH 7.5 y PETN 0.316, el pH fue ajustado a 7.2. Se comprobó la pureza de las cepas cada 30 días y se realizó resiembra en agar TSA con PETN (0.316 g/L).

4.2.2 Caracterización molecular y fenotípica de las cepas seleccionadas

4.2.2.1 Caracterización molecular

Purificación de DNA genómico. Las cepas fueron cultivadas en caldo TSB por 12 a 16 horas a 28 °C y el protocolo estuvo sujeto a las indicaciones del Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega®).

Amplificación del rRNA 16S. Se emplearon los iniciadores 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') y 536R (5'-GWA TTA CCG CGG CKG CTG-3'); el tamaño del producto de PCR esperado fue de 500 pb correspondiente al primer

tramo del gen rRNA 16S (Abanto, 2008), y se siguió las indicaciones de la KOD HOT start DNA polimerasa (Novagen®) para la reacción de PCR, la cual consistió en: desnaturalización inicial 95 °C por 2 min, 33 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 seg, hibridación a 62 °C por 10 seg, amplificación a 70 °C por 10 seg, y amplificación final a 70 °C por 10 min.

Electroforesis de DNA en geles de agarosa. Se empleó geles de agarosa al 1% en tampón TAE al 0.5%, solución de azul de bromofenol (0.25%) y sacarosa (40%) como tampón de carga, 1 Kb DNA *Ladder* (Promega®) como marcador de tamaño molecular, y se empleó 70 V durante una hora para la corrida electroforética. Para teñir el ADN se sumergió el gel en bromuro de etidio al 0.5% y se reveló las bandas de ADN en un transiluminador de luz UV.

Secuenciación del gen rRNA 16S. Los amplificados fueron secuenciados por la empresa MACROGEN USA, para lo cual se envió 30-50 µl de amplicón por reacción y los iniciadores a una concentración de 20 pmol/µl (5 pmol/reacción).

Caracterización molecular. Las secuencias consenso del gen rRNA 16S de las cepas seleccionadas fueron alineadas con los iniciadores 27F y 536R con el programa BioEdit 7.0.9 con el fin de comprobar que no se encontraban en las secuencias. Luego, éstas fueron comparadas con la base de datos del GenBank/EMBL/DDBJ usando la plataforma del programa local de alineamiento de secuencias BlastN versión 2.0. Seguido, se realizó un alineamiento múltiple con el programa BioEdit 7.0.9 con secuencias que presentaron similitud mayor o igual a 97% y Valor E 0.0, además de secuencias de otras especies relacionadas

obtenidas de la base de datos. Luego, los *gaps* fueron tratados con el mismo programa y finalmente se construyó el árbol filogenético con el programa Mega 5.0 empleando el método de Neighbor-Joining con un modelo Compuesto de Máxima Verosimilitud.

4.2.2.2 Caracterización fenotípica

Se realizó pruebas fenotípicas a las cepas seleccionadas según los resultados obtenidos de la caracterización molecular y el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Brenner *et al.*, 2005; De Vos *et al.*, 2009). Los ensayos se realizaron por triplicado.

4.2.3 Cinética de degradación de PETN por las cepas seleccionadas

El Tween 80 es un detergente no iónico que ha sido reportado por Park *et al.* (2003) como optimizador en la degradación del TNT por *Pseudomonas putida*, por lo cual se ensayó el efecto de este detergente en la degradación del PETN. Para esto se empleó caldo PETN más Tween 80 al 0.1% registrando sólo la concentración de PETN residual durante 50 horas.

Luego, para determinar la cinética de degradación del PETN de las cepas seleccionadas se realizó un seguimiento durante 82 horas en caldo PETN modificado compuesto por (g/L): K_2HPO_4 1.68, $MgSO_4$ 0.124, NaCl 0.5, succinato 6.80, KOH 7.5, PETN 0.316 y Tween 80 al 0.1%. La cuantificación del PETN residual y de las proteínas totales se realizó según las siguientes metodologías:

Cuantificación del PETN. Se adaptó del Método Oficial 964.25 de la AOAC (2002): Pentaeritritol tetranitrato en medicamentos y Shamsa *et al.* (2005). El protocolo fue el siguiente:

1. Las cepas seleccionadas fueron incubadas como en 4.2.1 e inoculadas al 0.2% por triplicado en Caldo PETN modificado e incubadas a 200 rpm y 28 °C.
2. Se colectó 2 mL de cultivo cada 12 horas aproximadamente.
3. Se adicionó 2 mL de ácido acético glacial concentrado y se homogenizó.
4. Se traspasó 1 mL del homogenizado de la muestra, del estándar (100 mg de nitrato de potasio en 100 mL de ácido acético glacial) y de ácido acético glacial (blanco) en fiolas independientes de 100 mL.
5. Se adicionó 4 mL de ácido fenoldisulfónico, se homogenizó y se dejó en reposo por 30 min en oscuridad.
6. Se adicionó 60 mL de agua destilada.
7. Se agregó 15 mL de hidróxido de amonio y se agitó suavemente hasta que se formó un color amarillo y se dejó enfriar.
8. Se completó el volumen con agua destilada y se homogenizó.
9. Se midió absorbancia a 408 nm.

Se empleó la siguiente fórmula para el cálculo del PETN residual:

$$\% \text{ de PETN} = \frac{A \times R2 \times K}{A' \times R1}$$

Donde:

R1= 0.158mg/mL (Concentración inicial)

R2 = 1mg/mL (Concentración del estándar)

A = Absorbancia de la muestra

A' = Absorbancia del estándar

K= 78.18 (constante)

Determinación de proteínas totales. Se mezcló 1 mL de cultivo con 1 mL de acetona y se centrifugó a 13 000 rpm por 3 min, luego se repitió este último procedimiento en 100 µl de acetona y se resuspendieron las células en hidróxido de sodio 0.1 M. Seguido se incubó a 80 °C por 5 min (Trott *et al.*, 2003). Finalmente, se empleó el método de Bradford (1976) para la cuantificación de proteínas totales y los valores obtenidos fueron extrapolados según el estándar de seroalbúmina bovina (Anexo 3).

4.2.5 Determinación de la actividad PETN reductasa

Obtención de extracto crudo. Se realizó a partir de un cultivo de 50 horas (fase exponencial tardía) en caldo PETN. El cultivo fue centrifugado a 4500 rpm por 10 min y se empleó 50 mM de tampón bis-tris propano (pH 7.0) para lavar y resuspender las células. Seguido, éstas fueron lisadas por sonicación mediante tres tiempos de 15 seg de lisis alternado con 15 seg de enfriamiento en hielo. Finalmente, se centrifugó a 13 000 rpm por 10 min a temperatura ambiente y se

filtró el sobrenadante en membrana de nitrocelulosa de 0.45 nm (Binks *et al.*, 1996).

Reacción enzimática. La actividad enzimática del extracto crudo se realizó por triplicado en 3 mL de reacción compuesta por 2 mL del filtrado y 1 mL de tampón bis-tris propano (pH 7.0), 0.2 mM de NADPH (concentración final) y 760 μ M de PETN (6 μ l de 380 mM PETN en acetona). La reacción se llevó a cabo en Baño María a 28 °C por 45 minutos. A continuación se realizó la inactivación del NADPH por adición de cianuro férrico y metosulfato de fenazina a una concentración final de 0.5 mM y 0.2 mM, respectivamente, y se midió la producción de nitritos mediante la reacción de Griess (Binks *et al.*, 1996) cuyos resultados fueron extrapolados de la curva estándar de nitritos (Anexo 4).

La oxidación de NADPH fue monitoreada a 350 nm al inicio y al final de la reacción y la cantidad de proteína en el filtrado se cuantificó mediante la reacción de Bradford (1976), y extrapolando los resultados de las curvas estándar de NADPH (Anexo 5) y seroalbúmina bovina (Anexo 3), respectivamente.

Finalmente, para realizar los cálculos una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de μ moles de NADPH oxidado por minuto, y se consideró que por cada molécula de PETN se liberaba dos moléculas de nitrito basado en los resultados obtenidos por Binks *et al.* (1996).

5. RESULTADOS

5.1 Cepas degradadoras de PETN

En total se ensayó por duplicado el crecimiento de 19 cepas en caldo PETN con glucosa como única fuente de carbono y trazas (ver 4.2.1) en condiciones de temperatura y agitación de 28 °C y 200 rpm respectivamente durante tres subcultivos continuos de 2, 5 y 7 días de incubación.

La Tabla 4 muestra que las cepas 3T12, 3T411 y J8A2 presentaron el mayor crecimiento, con un promedio de 0.112, 0.183 y 0.173 de densidad óptica (DO_{600}) respectivamente, luego del primer subcultivo a los 2 días de incubación; sin embargo sólo la cepa 3T12 mostró un crecimiento similar durante el segundo y tercer subcultivo de 5 y 7 días respectivamente, mientras que las cepas 3T411 y J8A2 disminuyeron su crecimiento (Tabla 4). Similar comportamiento a la primera mostraron las cepas 3T11, 2T41, 1T12, 1T5121 y P4a4b aunque con una DO_{600} menos significativa, y sólo la cepa J8A2 se mantuvo entre las cepas con mayor crecimiento durante los tres subcultivos ensayados en las mismas condiciones. Además, las cepas T1S11(2), J3S2A sólo crecieron durante el primer subcultivo y las cepas 3T1221, 2T31, 3T31 y P852a no mostraron crecimiento durante el primer subcultivo.

Por otro lado, entre las cepas M1A, M1B Y M1C, aisladas de suelo contaminado con derivados de hidrocarburo, sólo la cepa M1B mostró crecimiento con un DO_{600} promedio de 0.132, 0.120 y 0.125 durante el primer, segundo y tercer subcultivo, respectivamente.

En adición a esto, las cepas J8A2 y M1B fueron sembradas en agar mínimo P luego del tercer subcultivo e incubadas durante 24 horas a 28 °C y se observaron colonias con tamaños variables (Anexo 6), sin embargo también fueron sembradas en agar TSA e incubadas en las mismas condiciones donde se demostró la pureza del cultivo.

Finalmente, las cepas J8A2 y M1B fueron seleccionadas para evaluar su preferencia de fuente de carbono. Dicha preferencia se evaluó por duplicado en caldo PETN donde ambas cepas mostraron preferencia por el succinato (Tabla 5) mostrando DO_{600} promedio de hasta 0.140 para la cepa J8A2 luego del segundo subcultivo. Sin embargo, cabe resaltar que en el caso de J8A2 se inoculó el segundo subcultivo en caldo PETN tanto de glucosa y succinato al 1% a partir del primer subcultivo en caldo PETN con glucosa.

TABLA 4. Crecimiento en caldo PETN de cepas aisladas de ambientes mineros

Procedencia	Cepas	Densidad Óptica (600nm) ^b		
		Primer	Segundo	Tercer
		Subcultivo ^a (2 días)	Subcultivo ^a (5 días)	Subcultivo ^a (7 días)
Sistema de Tratamiento de Relave Minero (Región La Libertad)	1T522	0.048	0.036	0.095
	3T1221	-	-	-
	3T12	0.112	0.117	0.105
	3T11	0.056	0.065	0.064
	1T511	0.036	0.029	0.070
	2T41	0.027	0.017	0.041
	2T31	-	-	-
	3T411	0.183	0.163	0.090
	1T12	0.039	0.042	0.034
	1T5121	0.032	0.034	0.054
	3T31	-	-	-
Agua superficial del Lago Junín (Región Junín)	P4a4b	0.086	0.095	0.116
	P852a	-	-	-
	T1S11(2)	0.075	-	-
	J3S2A	0.070	-	-
	J8A2	0.173	0.146	0.141
Suelo contaminado con derivados de hidrocarburo (Región Lima)	M1A	-	-	-
	M1B	0.132	0.120	0.125
	M1C	-	-	-

^a En caldo PETN con glucosa como única fuente de carbono más trazas e incubados a 200 rpm y 28 °C.

^b Las densidades ópticas registradas son el promedio de dos repeticiones.

TABLA 5. Efecto del succinato y glucosa como fuente de carbono en el crecimiento en caldo PETN.

Cepas	Densidad Óptica (600nm) ^c			
	Primer Subcultivo ^a	Primer Subcultivo ^a	Segundo Subcultivo ^a	Segundo Subcultivo ^a
	(7 días) Glucosa	(7 días) Succinato	(7 días) Glucosa	(7 días) Succinato
M1B	0.054	0.086	0.029	0.044
J8A2 ^b	0.105	No sembrado	0.052	0.140

^a Caldo PETN sin glicerol con succinato o glucosa más trazas. Incubadas a 200 rpm y 28 °C.

^b Se sembró el segundo subcultivo en caldo PETN tanto de glucosa y succinato al 1% a partir del primer subcultivo en caldo PETN con glucosa.

^c Las densidades ópticas registradas son el promedio de dos repeticiones.

5.2 Amplificación y secuenciación del gen rRNA 16S

Se logró extraer satisfactoriamente el ADN de las cepas J8A2 y M1B con el *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega®) y se amplificó las 500 pb esperadas del gen rRNA 16S con los iniciadores y el protocolo mencionados en 4.2.2 (Figura 4).

Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos del EMBL/DDBJ/GenBank donde a la cepa J8A2 se le asignó el código de acceso HF568785.1 y la cepa M1B el código HF568786.1.

5.3 Cepas identificadas mediante análisis del gen rRNA 16S

La secuencia consenso del gen rRNA 16S de J8A2 fue comparada con la Base de Datos mediante el programa BLASTn 2.0, y se obtuvo como resultado una identidad de 99% y una similitud de 97% con *Bacillus licheniformis* Pb-WC09001 (HM006901.1),

Bacillus licheniformis I5 (EU030266.1), *Bacillus licheniformis* (AY479984.1), *Bacillus* sp. QS6 (HE662860.1), *Bacillus* sp. L166 (AM913973.1), así como con otras secuencias del género *Bacillus* no cultivables.

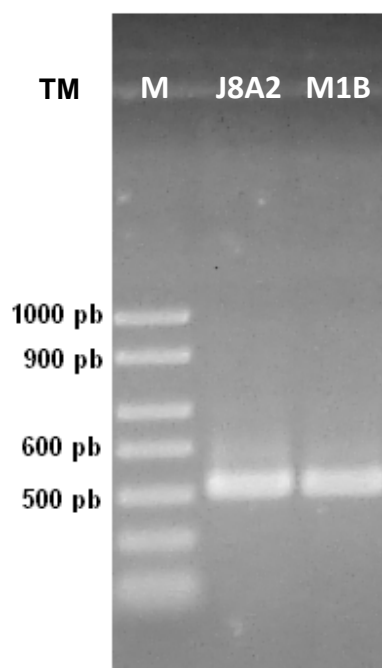


Figura 4. Amplicones de 500 pb del gen rRNA 16S de las cepas J8A2 y M1B .
M: marcador de tamaño molecular (TM) de 1000 pb.

Luego con el programa BioEdit 7.1.3 se alineó y editó la secuencia de rRNA 16S obtenida de J8A2 con las siguientes secuencias obtenidas de la Base de Datos: *Bacillus licheniformis* Pb-WC09001 (HM006901.1), *Bacillus licheniformis* (AY479984.1), *Bacillus licheniformis* BB10 (JN391533.1), *Bacillus licheniformis* MY75 (EF635428.1), *Bacillus subtilis* EM1B (JQ414045.1), *Bacillus subtilis* AN5 (JQ746509.1), *Bacillus anthracis* AIMST

Por otro lado, los resultados de la comparación de la secuencia rRNA 16S obtenida para la cepa M1B en el programa BLASTn 2.0 mostró una identidad de 100% y una similitud de 95% para *Enterobacter asburiae* KNUC5007 (JQ682630.1), *Enterobacter* sp. Gg10 (JN020643.1), *Enterobacter* sp. AAP4 (JF276427.1), así como para secuencias del género *Enterobacter* no cultivables.

Al igual que en el caso de J8A2 se empleó el programa BioEdit 7.1.3 para alinear y editar la secuencia de M1B con las siguientes secuencias obtenidas de la Base de Datos: *Enterobacter asburiae* KNUC5007 (JQ682630.1), *Enterobacter* sp. Gg10 (JN020643.1), *Enterobacter* sp. AAP4 (JF276427.1), *Enterobacter cloacae* An20-1 (AB244457.1), *Enterobacter cloacae* R10-1A (HQ154578.1), *Enterobacter hormaechei* AIMST (HQ694448.1), *Enterobacter hormaechei* S6-240 (JQ660198.1), *Enterobacter aerogenes* KNUC5001 (JQ682628.1) y *Enterobacter aerogenes* Ags-4 (FJ380123.1) (Anexo 2).

Posteriormente, se restringió las secuencias ya alineadas a 465 pb y se infirió el árbol filogenético de la cepa M1B empleando el mismo programa y los mismos parámetros que en J8A2 (Figura 6) y *R. prowazekii* Rp22 como grupo externo. Finalmente, se observó que la cepa M1B forma parte de un clado con 100% de probabilidad con diferentes especies del género *Enterobacter* (Figura 6), además las mismas especies no conformaron clados robustos como se observó en la Figura 5.

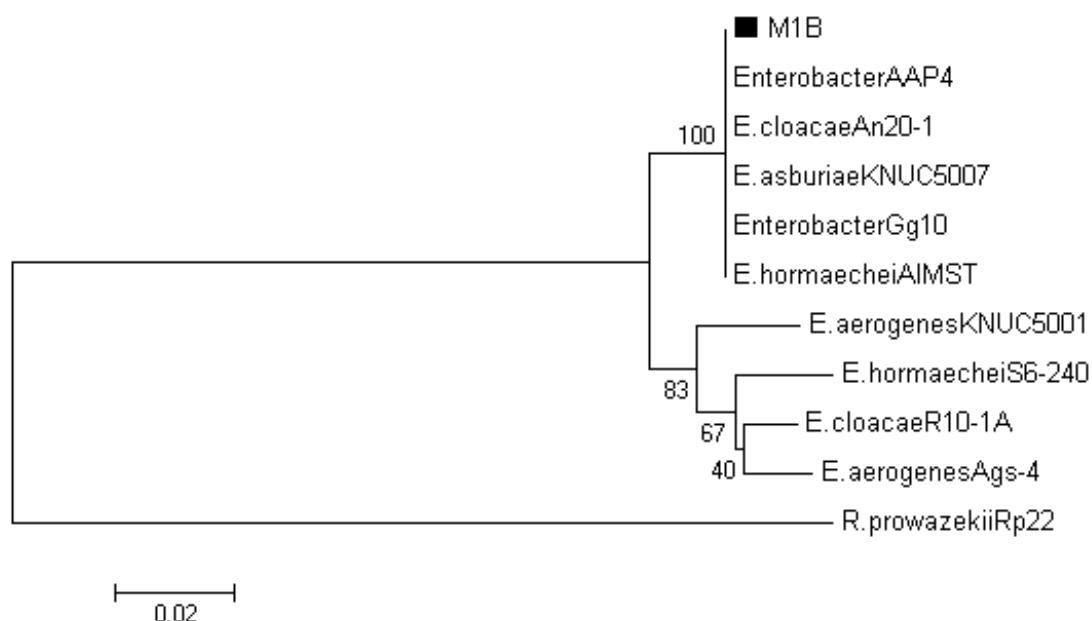


Figura 6. Árbol Filogenético de *Enterobacter* sp. M1B (HF568786.1) (■) en la que conforma un clado con 100% de probabilidad con diferentes especies del género *Enterobacter*. Los valores en los nodos de las ramas representa el porcentaje de *bootstraps* y el valor 0.02 bajo la barra representa el porcentaje de substituciones nucleotídicas.

5.4 Caracterización fenotípica de las cepas identificadas mediante análisis del gen rRNA 16S

La cepa J8A2 presenta las siguientes características fenotípicas incubada a 28 °C: bacilo corto gram negativo (24 horas en agar TSA), motil, usa citrato como única fuente carbono, no hidroliza almidón, producción de indol negativo, sin producción de H₂S, fermentación de glucosa con producción de acidez y gas, crecimiento en anaerobiosis, crecimiento en NaCl al 7%, inhibición del crecimiento a 50°C, rojo de metilo positivo y Voges-Proskauer negativo. Características culturales de colonia en agar TSA a 28 °C por 24 horas: plana, translúcida, con centro amarillo claro, sin pigmento difusible, borde irregular y un promedio de 3.0 mm de diámetro. Además, en algunas ocasiones presentó

la apariencia de un cultivo mixto con colonias de borde regular, convexas, mucoides y opacas (Anexo 7: Figuras A, B y C).

La cepa M1B presenta las siguientes características fenotípicas incubada a 28 °C (Anexo 7: Figura D): bacilo gram negativo (24 horas en agar TSA), móvil, citrato negativo, indol negativo, lisina descarboxilasa, arginina y ornitina dehidrolasa, sin producción de H₂S, fermentación de glucosa con producción de acidez y sin gas, rojo de metilo positivo débil y Voges-Proskauer negativo. Características culturales de colonia en agar TSA a 28 °C por 24 horas: convexa, blanca opaca, sin pigmento difusible, borde regular, lisas y un promedio de 2.0 mm de diámetro.

5.5 Cinética de degradación del PETN

El efecto del Tween 80 al 0.1% en la degradación de PETN fue ensayado por duplicado con la cepa J8A2 mostrando que la concentración de PETN presentaba fluctuaciones en ausencia de Tween 80 en comparación con la adición de éste. Como se observa en la Figura 7, la cuantificación de PETN en el medio sin Tween 80 registró valores mayores a los iniciales durante las 10 y 25 horas de incubación, en cambio, en el medio con Tween 80 se registró valores menores. A partir de estos resultados la cinética de degradación se llevó a cabo con la adición de Tween 80 al 0.1%

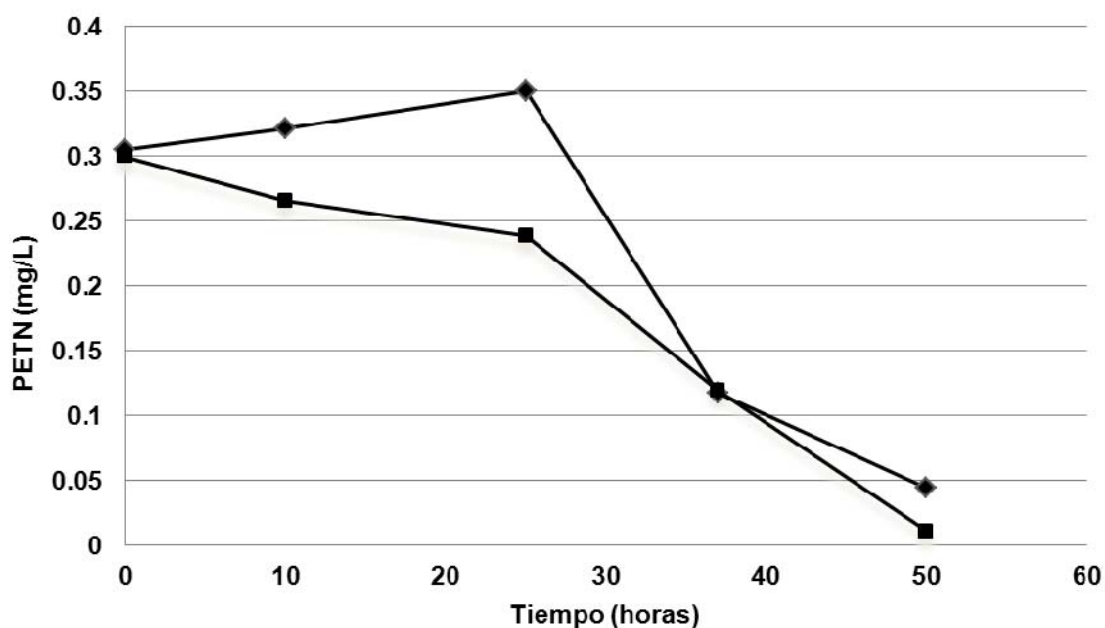


Figura 7. Efecto del Tween 80 (0.1%) en la degradación de PETN por la cepa J8A2 en caldo PETN sin glicerol y con succinato como única fuente de carbono. En adición de Tween 80 (■) y en ausencia de Tween 80 (◆), incubado a 28 °C y 200 rpm. Promedio de dos repeticiones.

Durante la cinética de degradación se colectó en total 8 muestras para cuantificar proteínas totales y PETN residual. Se debe tener en cuenta que para los cálculos mostrados a continuación se consideró la curva de crecimiento logarítmico a partir de las 10 horas hasta las 50 horas de cultivo de ambas cepas (Figura 8 y 9).

Las cepas M1B (Figura 8) y J8A2 (Figura 9) mostraron velocidades específicas de crecimiento de 0.057 h^{-1} y 0.042 h^{-1} respectivamente. Además, redujeron al 50% la concentración de PETN en menos de 35 horas, obteniéndose un rendimiento específico de degradación de 1.16 mmol de PETN/g de proteína.h para M1B y 0.72 mmol de PETN/g

de proteína.h para J8A2; y un rendimiento por sustrato de 21.56 ± 1.5 g de proteína/mol de PETN para M1B y de 39.7 ± 2.1 g de proteína/mol de PETN para J8A2.

A las 60 horas de cultivo se registró la mayor concentración de proteína de 16.74 g/L para ambas cepas, sin embargo la cepa M1B ya registraba valores de 4.27 g/L de PETN residual mientras que J8A2 aún registraba 51.56 g/L de PETN residual. Por otro lado, a las 72 horas de la cultivo se mostró una reducción en la cantidad de proteína, registrándose valores de 7.96 g/L para J8A2 y 9.15 g/L para M1B. Luego, a las 82 horas se registró un nuevo incremento de la concentración de proteína y la menor concentración de PETN, 2.12 mg/L para M1B y 4.25 mg/L para J8A2.

Adicionalmente, a los 5 días de incubación se observó que el cultivo de la cepa J8A2 desarrolló un pigmento amarillo en el medio en comparación con la cepa M1B. (Figura 10).

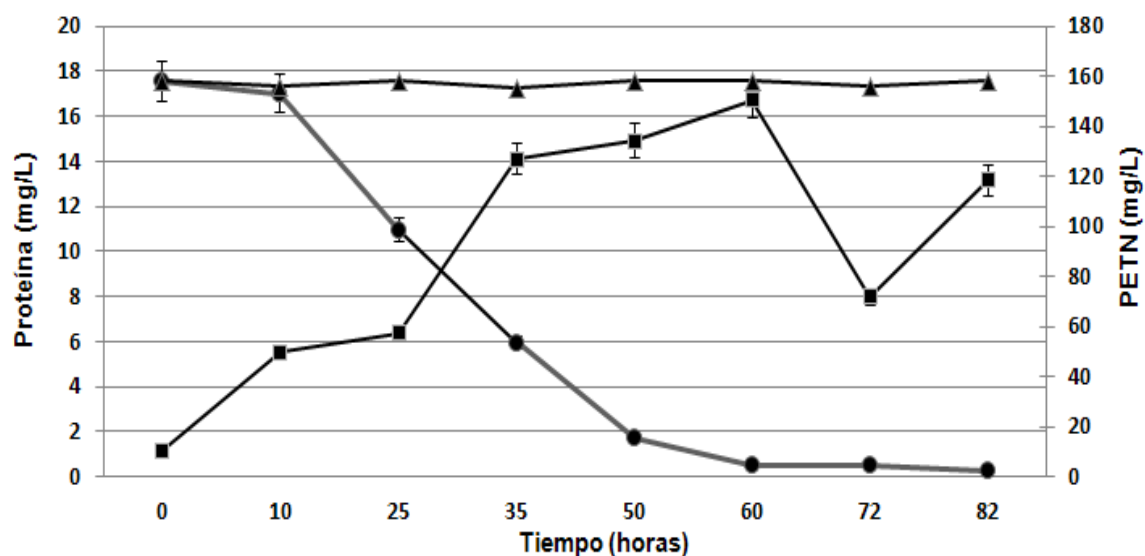


Figura 8. Cinética de degradación de PETN por *Enterobacter* sp. M1B incubado por triplicado a 28°C y 200rpm en caldo PETN modificado (ver 4.2.3). Concentración de PETN residual (●), concentración de proteína total (■), concentración de PETN en caldo sin inocular (▲). Error estándar del promedio de tres repeticiones (\pm).

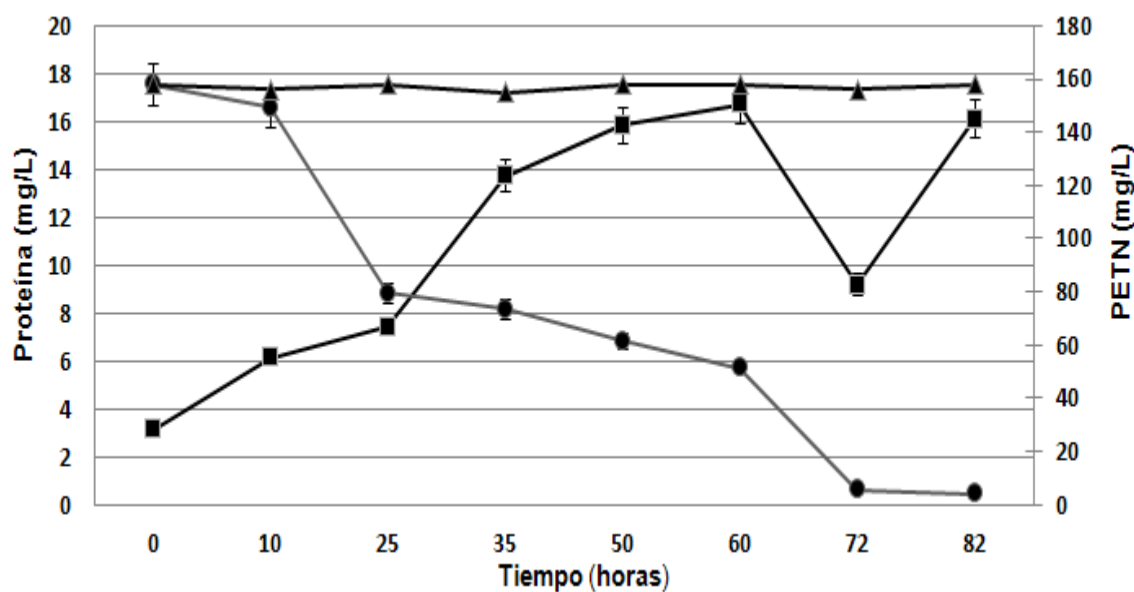


Figura 9. Cinética de degradación de PETN por *Bacillus* sp. J8A2 incubado por triplicado a 28°C y 200rpm en caldo PETN modificado (ver 4.2.3). Concentración de PETN residual (●), concentración de proteína total (■), concentración de PETN en caldo sin inocular (▲). Error estándar del promedio de tres repeticiones (\pm).



Figura 10. Cultivos de *Bacillus* sp. J8A2 (Izquierda) y *Enterobacter* sp. M1B (Centro) en caldo PETN modificado durante 5 días a 200 rpm y 28 °C. Control sin inocular (Derecha)

5.6 Actividad PETN reductasa

Se determinó la actividad PETN reductasa en extractos crudos obtenidos de la cepa J8A2 cultivada durante 60 horas en las mismas condiciones de la cinética de degradación. Todos los valores registrados fueron extrapolados de las curvas estándar de nitritos (Anexo 4) y de NADPH (Anexo 5), y todos los ensayos fueron realizados por triplicado según la metodología descrita en 4.2.5.

La velocidad específica de liberación de nitritos obtenida fue 4.6 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ a partir de 1.54 μmol de nitritos liberados por 7.43 μg de proteína total en 45 minutos y a 28 °C, y se registró la oxidación de 1.59 μmol de NADPH obteniéndose una velocidad

específica de oxidación de 4.7 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$. Por otro lado, los controles sin NADPH registraron valores inferiores de liberación de nitritos con un promedio de 1.5 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$.

Considerando que se liberan dos moléculas de NO^-2 de cada molécula de PETN (ver 4.2.5) se calculó que 1.54 μmol de nitritos fueron liberados a partir de 0.77 μmol de PETN. Entonces, la actividad específica (U) es de 1.03 mmol de PETN/h a partir de 7.43 mg de proteína total y la actividad específica por proteína (U/g) es 138.6 mmol de PETN/g.h.

6. DISCUSIÓN

6. 1 Identificación molecular y fenotípica de las cepas degradadoras de PETN

La secuencia parcial del gen rRNA ribosomal 16S de la cepa M1B sólo permitió identificarla dentro del género *Enterobacter* más no discriminar la especie dado que esta secuencia no siempre es suficiente para diferenciar especies dentro de la familia *Enterobacteriaceae* (Spröer *et al.*, 1999). Por otro lado, mejores resultados se han reportado con el gen *dnaJ*, codificante de chaperonas con función en el plegamiento de proteínas, que es empleado para diferenciar especies de la familia *Enterobacteriaceae*, sin embargo muestran a *Enterobacter pirynus* y *Enterobacter gorgoviae* más relacionados filogenéticamente a *Escherichia vulneris* (Nhung *et al.*, 2007).

Adicionalmente, algunas de las características fenotípicas ensayadas (ver 5.4) no concuerda con ninguna de las especies del género *Enterobacter* listadas en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Brenner *et al.*, 2005). Sólo con *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter kobei* comparte el mayor número de características fenotípicas: Voges-Proskauer negativo, indol negativo, arginina dehidrolasa y ornitina decarboxilasa. Finalmente, basado en estos resultados no fue posible establecer una relación taxonómica con ninguna especie del género *Enterobacter* por lo que la cepa M1B fue designada como *Enterobacter* sp.

Por otro lado, la secuencia parcial del gen rRNA ribosomal 16S de la cepa J8A2 permitió ubicarla dentro del clado de la especie *Bacillus licheniformis* con 99% de probabilidad según el árbol filogenético correspondiente (Figura 5). *B. licheniformis* forma

parte del grupo filogenético 1 determinado en base a la secuencia del gen rRNA ribosomal 16S y que incluye a especies como *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, entre otros (Wang y Sun, 2009). Dado que este grupo es uno de los más consistentes con la taxonomía actual se podría considerar los resultados filogenéticos del gen rRNA 16S para identificar especies de dicho grupo, sin embargo el análisis de las características fenotípicas son importantes para confirmar este resultado.

Según las características fenotípicas ensayadas para la cepa J8A2 (ver 5.4) y registradas en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (De Vos *et al.*, 2009), el uso de citrato como fuente de carbono, el crecimiento en 7% de NaCl y el crecimiento en anaerobiosis lo relacionó presuntivamente con *Bacillus licheniformis*, sin embargo, la coloración gram negativa, la ausencia de actividad amilolítica y la inhibición del crecimiento a 50 °C no permitió relacionarlo taxonómicamente con ninguna especie.

Cabe resaltar que el género *Bacillus* incluye especies gram positivas, gram negativas y gram variables (Drobniewski, 1993; De Vos *et al.*, 2009). Entre las especies halofílicas gram negativas se ha reportado a *Bacillus horti* (Yumoto 1998), así como se ha caracterizado cepas gram negativas de este género con capacidad de degradar queratina, como *Bacillus* sp. PW-1 (Joshi, 2007) que comparte las siguientes características fenotípicas con la cepa J8A2: motilidad, uso de citrato como única fuente carbono, sin actividad amilolítica, no produce H₂S y fermenta glucosa con producción de acidez y gas.

Por otro lado, los cambios morfológicos de colonia registrados son características muy particulares dentro del grupo relacionado con *Bacillus subtilis* y sobre todo en el caso de *Bacillus licheniformis* (De Vos *et al.*, 2009). Se han realizado estudios con respecto a la

relación entre variantes coloniales de *Bacillus licheniformis* y la producción de enzimas extracelulares, encontrándose que colonias variantes traslúcidas secretaban más enzimas proteolíticas y menos enzimas amilolíticas que las colonias opacas originales (Carlisle, 1989). Además, otro estudio reporta que probables variantes coloniales de *B. licheniformis* de superficie rugosa y lisa producían enzimas quitinolíticas ineficientes debido a una mutación puntual, pero secretaban altas concentraciones de enzimas proteolíticas, amilolíticas y celulolíticas activas (Waldeck, 2006). Sin embargo, en ambos casos no relacionaron directamente la variación de las características coloniales de una misma cepa de *B. licheniformis* con un incremento en la secreción de enzimas, ya que también encontraron variantes con las mismas características fenotípicas y genotípicas con patrones de secreción enzimática diferente.

Finalmente, teniendo en cuenta las observaciones culturales de colonia y los resultados de los análisis filogenéticos y fenotípicos podemos afirmar que la cepa J8A2 mantiene una similitud significativa con la especie *Bacillus licheniformis* a nivel de la secuencia parcial del gen rRNA 16S, sin embargo algunas de las características fenotípicas reportadas son incongruentes con dicha especie por lo que dicha cepa ha sido designada como *Bacillus* sp.

6. 2 Cepas degradadoras de PETN

A diferencia de *Enterobacter cloacae* PB2 y *Agrobacterium radiobacter* que han sido aisladas de lodos residuales de plantas de tratamiento (Binks *et al.*, 1996; White *et al.*, 1996) y los géneros *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Cupriavidus* y *Comamonas* de campos de prueba de explosivos (García, 2011), *Enterobacter* sp M1B fue aislado de

suelo impactado por derivados de hidrocarburos circunscrito en una zona de explotación minera. Cabe resaltar que el género *Enterobacter* ha sido reportado como degradador de alcanos y distintos hidrocarburos aromáticos policíclicos (PHAs) (Hua *et al.*, 2010; Katsivela *et al.*, 2003), por lo que es común encontrar este género de bacterias en suelos contaminados con dichos compuestos.

Por otro lado, el género *Bacillus* ha sido reportado como degradador de TNT y TNP (2,4,6 trinitrofenol). *Bacillus* sp. YRE1 ha sido aislado de efluente rojo de factorías, y el ensayo de biodegradación de TNT de estas células inmovilizadas ha mostrado una reducción de hasta 93.81% y 94%, cuando se emplea carbón vegetal y poliestireno como sustrato, respectivamente (Yasin *et al.*, 2008; Ullah *et al.*, 2010). Además, *Bacillus cereus* PU aislado de suelo contaminado con explosivos ha mostrado la capacidad de degradar TNP (ácido pícrico) logrando liberar 2.1 ± 0.15 mol de nitrito/mol de TNP con una velocidad específica de degradación de 539 $\mu\text{mol/h.g}$ de peso húmedo (Singh *et al.*, 2011). Ahora, estos reportes del género *Bacillus* como degradadores de TNT y TNP conducen al planteamiento que la cepa *Bacillus* sp. J8A2 identificada en el presente trabajo de investigación sea potencial degradador de estos compuestos.

6.3 Evaluación de la cinética de degradación de PETN

En reportes anteriores responsabilizan la baja solubilidad del PETN como limitante para detectar con precisión su concentración, ya que se han registrado curvas de degradación muy irregulares en comparación con el presente estudio.

En la Figura 7, la biodegradación de PETN sin Tween 80 muestra una fluctuación y por ende dificultad en detectar con precisión la concentración de PETN residual, tal y como ha sido reportado por White *et al.* (1996) y García (2011) empleando HPLC como método de detección. La causa se le atribuye a la baja solubilidad del PETN que genera agregados gruesos que precipitan, además de la probable retención de éste por la biopelícula formada en la superficie.

Por otro lado, el Tween 80 facilitó a mantener la concentración de PETN residual impidiendo la formación de agregados del mismo y la retención de éste por la biopelícula formada en la superficie, ya que también retrasó la formación de agregados celulares. Además, el Tween 80 permitió reducir la concentración de PETN en menos tiempo, dado su capacidad de facilitar el ingreso de nutrientes a la célula, como también se ha reportado en la degradación de otros explosivos como el TNT (Park *et al.*, 2003; Yasin *et al.*, 2008; Ullah *et al.*, 2010). Entonces, el empleo de Tween 80 como aditivo en la degradación de PETN es un parámetro a tener en cuenta para optimizar dicha actividad.

Las velocidades específicas de crecimiento de las cepas M1B y J8A2, 0.057 h^{-1} y 0.042 h^{-1} respectivamente, son comparables entre sí; mientras que la velocidad específica de crecimiento de *Enterobacter cloacae* PB2 es 0.112 h^{-1} (Binks *et al.*, 1996), 1.9 veces más que M1B y 2.7 veces más que J8A2. Sin embargo, el rendimiento de J8A2, 39.7 g de proteína por mol de PETN, fue 1.8 veces más que el rendimiento de M1B lo que significa una mayor cantidad de grupos NO_2 del explosivo incorporados al metabolismo de J8A2.

Por otro lado, *E. cloacae* PB2 registró un rendimiento de 43.6 ± 2.4 g de proteína por mol de PETN, 1.09 veces más que el rendimiento obtenido por J8A2 lo cual los hace

comparables en este aspecto. Sin embargo, las condiciones de incubación ensayadas para *E. cloacae* PB2 fueron de 30 °C y 170 rpm de agitación, mientras que en el presente estudio se realizó a 28 °C y 200 rpm.

Ambas cepas redujeron a la mitad la concentración de PETN en un promedio de 35 horas, mientras que *E. cloacae* PB2 es capaz de reducir la misma cantidad en menos de 30 horas; sin embargo, se debe tener en cuenta que la concentración inicial en el presente estudio fue de 158 mg/L, mientras que en la cinética de *E. cloacae* PB2 fue de 32 mg/L aproximadamente. En adición a esto, estudios de degradación de PETN y TNT en conjunto muestran que la degradación de la mitad de la concentración de PETN en aproximadamente 30 horas de una concentración inicial de 100 mg/L (García, 2011).

Las velocidades específicas de degradación obtenidas (Figura 8 y 9), 1.16 mmol de PETN/g de proteína.h para M1B y 0.72 mmol de PETN/g de proteína.h, muestran que la cepa M1B fue capaz de convertir en proteína 1.6 veces más PETN por hora que la cepa J8A2, mientras que *Enterobacter cloacae* PB2 mostró una velocidad específica de degradación de 1.03 mmol de PETN/g de proteína.h similar al de M1B, pero 1.4 veces más que J8A2.

Con respecto al viraje a amarillo del cultivo de la cepa J8A2 en caldo PETN (Figura 10) se plantea lo siguiente. La enzima PETN reductasa posee un grupo prostético de FMN (Flavin mononucleótido) el cual es común dentro de la familia de flavoenzimas y evidencia un color amarillo claro con la mayor absorbancia a 470 nm cuando es purificado. Esta característica se ha reportado en el estudio de las *old yellow enzyme* (OYE) homólogos de

Pseudomonas putida, XenA, XenB, XenC, XenE y XenF, relacionados con la degradación de compuestos nitroaromáticos como TNT (Van Dillewijn *et al.*, 2008).

Además, el ciclo catalítico de la PETN reductasa comprende una reacción de dos pasos. La primera es reductiva, donde la enzima es reducida por el NADPH hasta obtener la forma dihidroquinona del grupo prostético FMN de la enzima. Luego, en la segunda reacción oxidativa la FMN es oxidada por grupos NO₂ del explosivo (Khan *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2004). Por otro lado, otro reporte afirma que los cristales de PETN en estado reducido son incoloros y en su estado oxidado son amarillos brillantes (Khan *et al.*, 2005), por lo que el PETN reducido no aporta cambio de color en el medio. Entonces, el cambio de color podría deberse a la producción de flavoenzimas y la completa oxidación de FMN que en consecuencia desarrolla el color amarillo del medio.

6.4 Evaluación de la actividad PETN reductasa

Tanto la velocidad específica de liberación de NO⁻² como la velocidad específica de oxidación de NADPH mostrado por la cepa *Bacillus* sp. J8A2, 4.6 µmol/min.mg de proteína y 4.7 µmol/min.mg de proteína respectivamente, demuestran que se requiere de una molécula de NADPH para liberar una molécula de nitrito, lo cual fue confirmado por los controles sin NADPH que registraron una velocidad específica de liberación de NO₂ de 1.5 µmol/min.mg, 3.1 veces menos que los ensayos con NADPH. El mismo resultado fue reportado para *E. cloacae* PB2 que mostró 4.6 µmol/min.mg de velocidad específica de liberación de NO⁻² y 4.2 µmol/min.mg de velocidad específica de oxidación de NADPH (Binks *et al.*, 1996), Esto sugiere que la vía de degradación (Figura 3) puede ser la misma para ambas cepas.

La actividad específica por proteína (U/g) 9.7 mmol de PETN/g.h de *Enterobacter cloacae* PB2 sugiere una liberación lenta de nitritos al medio durante su crecimiento, pero su velocidad específica de crecimiento de 0.112 h^{-1} y velocidad específica de degradación de 1.03 mmol de PETN/g de proteína.h sugieren un incorporación rápida de estos a su metabolismo, lo cual podría impedir una acumulación de nitritos en el medio disminuyendo así la concentración y toxicidad de éste.

La toxicidad del nitrito se debe a su gran capacidad oxidante sobre metales pesados, que en el hombre y animales produce la metahemoglobinemia (Lewis *et al.*, 1986; Martínez y Velázquez; 1998; Evangelista *et al.*, 2006; Tilak *et al.*, 2007), la cual consiste en la oxidación del hierro que interrumpe el transporte de oxígeno; y en el caso de las bacterias es posible que interfiera con el sistema transportador de electrones dado que varios de sus componentes presentan grupos prostéticos de hierro o hierro-azufre (Madigan *et al.*, 2012).

Por otro lado, *Bacillus* sp. J8A2 muestra un comportamiento contrario reflejado en una mayor actividad específica por proteína (U/g) de 138.6 mmol de PETN/g.h que sugiere mayor liberación de nitritos, sin embargo presenta una menor velocidad específica de crecimiento de 0.042 h^{-1} y velocidad específica de degradación de 0.72 mmol de PETN/g de proteína.h. Tal efecto podría atribuírsele a la toxicidad de los nitritos acumulados en el medio, lo que explicaría la limitación de crecimiento de las cepas *Bacillus* sp. J8A2 y *Enterobacter* sp. M1B durante las respectivas cinéticas ensayadas (Figuras 8 y 9) alcanzando a producir sólo 16.74g/L de proteína total.

7. CONCLUSIONES

1. Se demostró la presencia de bacterias degradadoras de PETN, *Bacillus* sp. J8A2 y *Enterobacter* sp. M1B, aisladas de ambientes mineros.
2. La secuencia parcial del gen rRNA 16S y la caracterización fenotípica permitieron identificar a la cepa J8A2 como *Bacillus* sp. y a la cepa M1B como *Enterobacter* sp.
3. *Enterobacter* sp. M1B logró degradar el 97% de PETN a las 60 horas mientras que *Bacillus* sp J8A2 lo realizó a las 72 horas.
4. El rendimiento por sustrato de *Bacillus* sp. J8A2 fue 1.8 veces más eficiente que el registrado para la cepa *Enterobacter* sp. M1B.
5. La actividad específica por proteína del extracto celular de *Bacillus* sp. J8A2 sobre PETN fue 14.2 veces mayor al reportado para *Enterobacter cloacae* PB2.

8. RECOMENDACIONES

Conociendo la capacidad de degradación de PETN de la cepa *Bacillus* sp. J8A2 es probable que también posea la capacidad de degradar TNT y TNP.

Se debe estudiar la enzima o enzimas involucradas en la degradación de PETN por *Bacillus* sp. J8A2 ya que podrían ser empleadas como potencial herramienta biotecnológica.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABANTO MARÍN, Michel Francisco. “*Diversidad molecular de bacterias oxidadoras de hierro aisladas de drenajes ácidos de minas del Perú*”. Asesor: Dr. Pablo Ramírez Roca. Tesis Magister en Biología Molecular. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, 2008.

AOAC.2002. Official Method 964.25: Pentaerythrityl tetranitrate in drugs.

ALTSCHUL, Stephen; Gish, Warren; Miller, Webb; Myers, Eugene; Lipman, David. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990, vol. 215 n° 3, p. 403–410.

BINKS, Peter; French, Christopher; Nicklin, Stephen; Bruce, Neil. Degradation of pentaerythritol tetranitrate by *Enterobacter cloacae* PB2. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996, vol. 62, n° 4, p. 1214–1219.

BRENNER, Don; Krieg, Noel; Staley, James. *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Volume two: The proteobacteria part B the Gammaproteobacteria). Editor in Chief: George M. Garrity. Segunda edición. London New York: Springer Dordrecht Heidelberg, 2005. 1136 p. ISBN 0-387-95040-0.

BRADFORD, Marion. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemical* vol. 72, p. 248-54.

CARLISLE, Glenn y Falkinham III, Joseph. Enzyme Activities and Antibiotic Susceptibility of Colonial Variants of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989, vol. 55, n° 11, p. 3026-3028.

DE VOS, Paul; Garrity, George; Jones, Dorothy; Krieg, Noel; Ludwig, Wolfgang; Rainey, Fred; Schleifer, Karl-Heinz; Whitman, William. *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Volume three: The firmicutes). Editor in Chief: Michael Goodfellow Segunda edición. London New York: Springer Dordrecht Heidelberg, 2009. 1450 p. ISBN: 978-0-387-95041-9.

DROBNIEWSKI, F.A. *Bacillus cereus* and related species. *Clinical Microbiology Reviews*. 1993, vol. 6, n° 4, p. 324-338.

EPA. Handbook on the Management of Munitions Response Actions. Interim Final. EPA 505-B-01-001 [documento en línea] 2005. <<http://nepis.epa.gov/Exe>> [consulta: 13 mayo 2012]

EPA. Environmental Protection Agency - Method 8330B: Nitroaromatics, nitramines, and nitrate esters by high performance liquid chromatography (HPLC). 2006.

ESTEVE-NUÑEZ, Abraham; Caballero, Antonio; Ramos, Juan. Biological Degradation of 2,4,6 Trinitrotoluene. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2001, vol. 65, n° 3, p. 335–352.

Estudios Mineros del Perú S.A.C. Manual de Minería [documento en línea] 2005. <http://ingenierosdeminas.org/biblioteca_digital/libros/Manual_Mineria.pdf> [consulta: 15 enero 2011]

EVANGELISTA, Marcela; Prada, Dora; Digón, Ana; Ezpeleta, Daniel; Giunípero, Gloria; Piola, Juan. Brote de intoxicación con nitrito de sodio asociado a manejo inadecuado de residuos sólidos en Rosario, Argentina, 2003. *Rev. Méd. Rosario*. 2006, vol.72, p. 67–72.

EXSA S.A.C. Misión y Visión [documento en línea] 2008. <<http://www.exsa.com.pe/mision-vision.html>> [consulta: 5 abril 2011]

FAMESA S.A.C. Misión y Visión [documento en línea] 2010.
<<http://www.famesa.com.pe/MisionVision.htm>> [consulta: 5 abril 2011]

FOLTZ, M. F. Aging of Pentaerythritol Tetranitrate (PETN). U.S. Department of Energy and Lawrence Livermore National Laboratory. [documento en línea] Julio, 2009.
<<https://e-reports-ext.llnl.gov/pdf/372573.pdf>> [consulta: 13 mayo 2012]

FRENCH, Christopher; Nicklin, Stephen; Bruce, Neil. Aerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by pentaerythritol tetranitrate reductase. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998, vol. 64, n° 8, p. 2864–2868.

FRENCH, Christopher; Nicklin, Stephen; Bruce, Neil. Sequence and properties of pentaerythritol tetranitrate reductase from *Enterobacter cloacae* PB2. *Journal of Bacteriology*. 1996, vol. 178, n° 22, p. 6623–6627.

FRENCH, Christopher; Rosser, Susan; Davies, Gareth; Nicklin, Stephen; Bruce, Neil. Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing pentaerythritol tetranitrate reductase. *Nature Biotechnology*. 1999, vol. 17, p. 491-495.

GARCÍA BONILLA, Erika Johanna. “Recuperación y evaluación de la capacidad degradadora de consorcios bacterianos aislados de ambientes impactados con TNT y PETN”. Asesores: Ph.D Fabio Roldán, Ph.D Pedro Filipe de Brito Brandão. Tesis Magister en Ciencias Microbiología. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2011.

GRIESBERGER, Martina; Kollau, Alexander; Wölkart, Gerald; Wenzl, Verena; Beretta, Matteo; Russwurm, Michael; Koesling, Doris; Schmidt, Kurt; Gorren, Antonius; Mayer, Bernd. Bioactivation of Pentaerythrityl Tetranitrate by Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase. *Molecular Pharmacology*. 2011, vol. 79, n°. 3, p. 541–548.

Global Security. Military explosives: PETN [Pentaerythritol tetranitrate] [documento en línea] 2011. <<http://www.globalsecurity.org/military/systems/munitions/explosives-nitrate-petn.htm>> [consulta: 20 febrero 2011]

HALL, Tom. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp.* 1999, vol. 41, p. 95-98.

HUA, Xiufu; Wu, Zuojun; Zhang, Hongxing; Lu, Diannan; Wang, Min; Liu, Yongmin; Liu, Zheng. Degradation of hexadecane by *Enterobacter cloacae* strain TU that secretes an exopolysaccharide as a bioemulsifier. *Chemosphere*. 2010, vol. 80 n° 8, p. 951–956.

IBEANUSI, Victor; Jeilani, Yassin; Houston, Samantha; Doss, Danielle; Coley, Bianca. Sequential anaerobic–aerobic degradation of munitions waste. *Biotechnology Letters*. 2009, vol. 31, p. 65–69.

JAW, KS; Lee, JS. Thermal behaviors of PETN base polymer bonded explosives. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2008, vol. 93, n°3, p. 953-957.

JOSHI, Savitha; Tejashwini M.M.; Revati N.; Sridevi R.; Roma D. Isolation, Identification and Characterization of a Feather Degrading Bacterium. *International Journal of Poultry Science*. 2007, vol. 6, n° 9, p. 689-693.

KANAGAWA, Takahiro and Mikami, Eiichi. Survival of a non-flocculating bacterium, *Thiobacillus thioparus* tk-1, inoculated to activated sludge. *Water Research*. 1995, vol. 29, n° 12, p. 2751-2754.

KATSIVELA, Eleftheria; Moore, Edward; Kalogerakis, Nicolas. Biodegradation of Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons: Specificity among Bacteria Isolated from Refinery Waste Sludge. *Water, Air, & Soil Pollution: Focus*. 2003, vol. 3, p. 103-115.

KHAN, Huma; Harris, Richard; Barna, Terez; Craig, Daniel; Bruce, Neil; Munro, Andrew; Moody, Peter; Scrutton, Nigel. Kinetic and Structural Basis of Reactivity of PentaerythritolTetranitrate Reductase with NADPH, 2-Cyclohexenone, Nitroesters and Nitroaromatic Explosives. *The journal of biological chemistry*. 2002, vol. 277, n° 24, p. 21906–21912.

KHAN, Huma; Barna, Terez; Harris, Richard; Bruce, Neil; Barsukov, Igor; Munro, Andrew; Moody, Peter; Scrutton, Nigel. Atomic Resolution Structures and Solution Behavior ofEnzyme-Substrate Complexes of *Enterobacter cloacae* PB2 Pentaerythritol Tetranitrate Reductase. *The journal of biological chemistry*. 2004, vol. 279, n° 29, p. 30563–30572.

KHAN, Huma; Barna, Terez; Bruce, Munro, Andrew; Leys, David; Scrutton, Nigel. Proton transfer in the oxidative half-reaction of pentaerythritol tetranitrate reductase. *FEBS Journal*. 2005, vol. 272, p. 4660–4671.

KOŚMICKI, MA; Malczewska, B; Sadowski, Z. Clinical evaluation of pentaerythritol tetranitrate in two doses in patients with stable angina pectoris. *Przegl Lek*. 2005, vol. 62 n° 1, p. 8-12.

KUMAR Sudhir, Nei Masatoshi, Dudley Joel, Tamura Koichiro. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*. 2008, vol.9 n°4, p. 299-306.

LEWIS, William; Morris, M.; Donald, P. Toxicity of Nitrite to Fish: A review. *Transactions of The American Fisheries Society*. 1986, vol. 115, p. 183-195.

MADIGAN, Michael; Martinko, John; Stahl. David; Clark, David. *Brock Biology of Microorganisms*. 13th ed. San Francisco, CA 94111: Pearson Education, 2012. 1154 p. ISBN-13: 978-0-321-64963-8.

MARTÍNEZ, Jesús y Velázquez, Raúl. Intoxicación por sustancias metahemoglobinizantes. Estudio retrospectivo de 39 pacientes. *Rev Cubana Med*. 1998, vol. 37, n° 2, p. 77-82

MESTAS-RODRIGUEZ, M.; RAMÍREZ, P.; PECEROS-MENCHOR, M. "Biodegradación del ion tiocianato empleando bacterias aisladas de aguas tratadas". En: XVIII Congreso Nacional de Biología. Ayacucho, Perú. 24-29 octubre 2010.

NHUNG, Pham; Ohkusua, Kiyofumi; Mishimab, Noriko; Nodaa, Makiko; Shaha, Mohammad; Suna, Xiaosong; Hayashia, Masahiro; Ezakia, Takayuki. Phylogeny and species identification of the family *Enterobacteriaceae* based on *dnaJ* sequences. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2007, vol. 58, p. 153–161.

NYANHONGO, Gibson; Nina, Aichernig; Ortnr, Marcus; Steiner, Walter; Guebitz, George. A novel environmentally friendly 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) based explosive. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 2008, vol. 27, n°2, p. 107–116.

PARK, Chulhwan; Kim, Tak-Hiun; Kim, Sangyong; Kim, Seung-Wook; Lee, Jinwon; Kim, Sun-Hwan. Optimization for biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Pseudomonas putida*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2003, vol. 95, n° 6, p. 567-571.

PAUL, Debarati; Pandey, Gunjan; Jain, Rakesh. Suicidal genetically engineered microorganisms for bioremediation: Need and perspectives . *BioEssays*. 2005, vol. 27, n° 5, p. 563–573.

PAUTZ, Andrea; Rauschkolb, Peter; Schmidt, Nadine; Art, Julia; Oelze, Matthias; Wenzel, Philip, Förstermann, Ulrich; Daiber, Andreas; Kleinert, Hartmut. Effects of nitroglycerin or pentaerithrityl tetranitrate treatment on the gene expression in rat hearts: evidence for cardiotoxic and cardioprotective effects. *Physiol Genomics*. 2009, vol. 38, p. 176–185.

Proinversion. La exploración minera en el Perú: documento de trabajo [documento en línea] 2007. <<http://www.proinversion.gob.pe/RepositorioAPS/0/0/JER/PUBLICACIONES/documentos/ProInversion-GuiaDeExploracionMinera2007.pdf>> [consulta: 20 enero 2011]

QUINN, Michael; Crouse, Lee; McFarland, Craig; LaFiandra, Emily; Johnson, Mark. Reproductive and developmental effects and physical and chemical properties of pentaerythritol tetranitrate (PETN) in the rat. *Birth Defects Research (Part B)*. 2009, vol. 86, p. 65–71.

SHAMSA, Fazel. Stability of trinitroglycerin in polyethylene glycol 400. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005, vol. 1, n° 4, p. 203-207.

SINGH, Baljinder; Kaur, Jagdeep; Singh, Kashmir. 2,4,6-Trinitrophenol degradation by *Bacillus cereus* isolated from a firing range. *Biotechnology Letters*. 2011, vol. 33, p. 2411–2415.

SINGH, Baljinder; Kaur, Jagdeep; Singh, Kashmir. Microbial remediation of explosive waste. *Critical Reviews in Microbiology*. 2012, vol. 38, n° 2, p. 152–167.

SINIA (Sistema Nacional de Información Ambiental). Plan nacional de implementación del Convenio de Estocolmo sobre los contaminantes orgánicos persistentes [documento en línea] 2007. <<http://sinia.minam.gob.pe/index.php?idElementoInformacion=213>> [consulta: 15 marzo 2011]

SPRÖER, Cathrin; Mendrock, Ulrike; Swiderski, Jolantha; Lang, Elke; Stackebrandt, Erko. The phylogenetic position of *Serratia*, *Buttiauxella* and some other genera of the family *Enterobacteriaceae*. *Int J Syst Bacteriol*. 1999, vol. 49, p. 1433–1438.

TILAK, K.S.; Veeraiah K.; Prema Raju, J. Milton. Effects of ammonia, nitrite and nitrate on hemoglobin content and oxygen consumption of freshwater fish, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). *Journal of Environmental Biology*. 2007, vol. 28, n° 1, p. 45-47.

TROTT, Sandra; Nishino, Shirley; Hawari, Jalal; Spain, Jim. Biodegradation of the nitramine explosive CL-20. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, vol. 69, n° 3, p. 1871–1874.

ULLAH, Hafiz; Ali Shah, Aamer; Hasan, Fariha; Hameed, Abdul. Biodegradation of trinitrotoluene by immobilized *Bacillus* sp. YRE1. *Pak. J. Bot.* 2010, vol. 42, n° 5, p. 3357-3367.

USA-CHPPM. Wildlife Toxicity Assessment for pentaerythritol tetranitrate (PETN). Final Report Document N°: 37-EJ1138-01G [documento en línea] 2001. <[http://usaphcapps.amedd.army.mil/erawg/tox/files/WTa\(PETN\)_FINAL.pdf](http://usaphcapps.amedd.army.mil/erawg/tox/files/WTa(PETN)_FINAL.pdf)> [consulta 20 marzo 2012]

VAN DILLEWIJN, Pieter; Wittich, Rolf-Michael; Caballero, Antonio; Ramos, Juan-Luis. Subfunctionality of Hydride Transferases of the Old Yellow Enzyme Family of Flavoproteins of *Pseudomonas putida*. *Applied and environmental microbiology*. 2008, vol. 74, n° 21, p. 6703–6708.

WALDECK, Jens; Daum, Gabriele; Bisping, Bernward; Meinhardt, Friedhelm. Isolation and Molecular Characterization of Chitinase-Deficient *Bacillus licheniformis* Strains Capable of Deproteinization of Shrimp Shell Waste To Obtain Highly Viscous Chitin. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, vol. 72, n° 12, p. 7879–7885.

WANG, Wei y Sun, Mi. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from 16S rDNA sequences. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009, vol. 40, p. 505-521.

WHITE, Graham; Snape, Jason; Nicklin, Stephen. Biodegradation of glycerol trinitrate and pentaerythritol tetranitrate by *Agrobacterium radiobacter*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996, vol. 62, n° 2, p.637–642.

WILLIAMS, Richard; Rathbone, Deborah; Scrutton, Nigel; Bruce, Neil. Biotransformation of Explosives by the Old Yellow Enzyme Family of Flavoproteins. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004, vol. 70, n°6, p. 3566–3574.

YASIN, Muhhamad; Ali Shah, Aamer; Hameed, Abdul; Ahmed, Safia; Hasan Fariha. Use of microorganisms for the treatment of trinitrotoluene (TNT) containing effluents. *J.Chem.Soc.Pak*. 2008, vol. 30, n° 3, p. 442-448.

YUMOTO, Isao; Yamazaki, Koji; Sawabe, Tomoo; Kawazuaki, Nakano; Kawasaki, Kosei; Ezura, Yoshio; Shinano, Haruo. *Bacillus horti* sp. nov., a new Gram-negative alkaliphilic bacillus. 1998, vol. 48, p. 565-571.

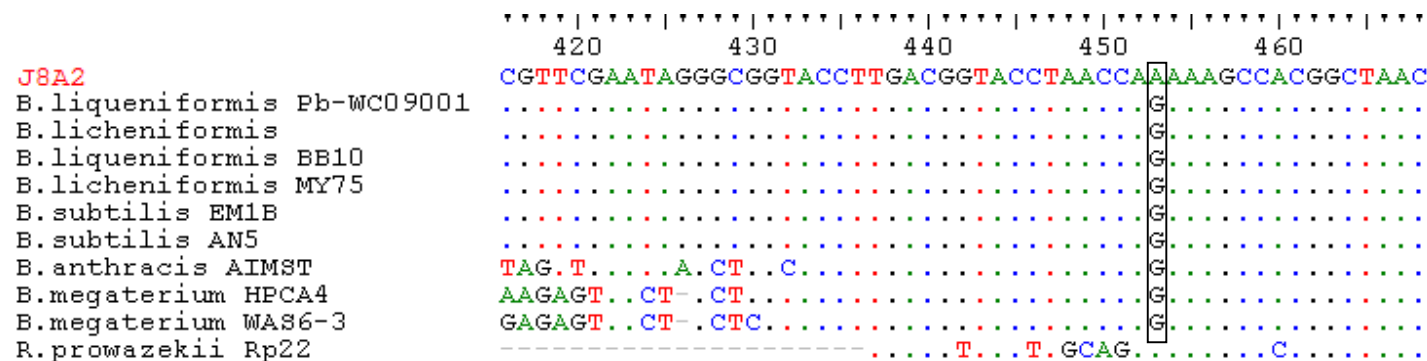
ANEXO 1. ALINEAMIENTO DEL GEN rRNA 16S DE LA CEPA J8A2

	10	20	30	40	50	60
J8A2	TGCAAGTCGAGCGGACAGAT	GGGAGCTTGCTCCC	TGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGT			
B.liqueniformis Pb-WC09001
B.licheniformis
B.liqueniformis BB10
B.licheniformis MY75
B.subtilis EM1B
B.subtilis AN5
B.anthraxis AIMST	A.TG...TAA.....TTA..A
B.megaterium HPCA4	A..T...--AGAGC...T.TA..C
B.megaterium WAS6-3	A..T...TA.A.....T.TA..C
R.prowazekii Rp22	A.....TTA.C-TA.....C...TTAG.T.-A...T..A

	120	130	140	150	160	170	180
J8A2	ACCGG-ATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATTATAAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACCTTAC						
B.liqueniformis Pb-WC09001
B.licheniformis
B.liqueniformis BB10
B.licheniformis MY75	A..
B.subtilis EM1B	G...T	AC	C-G
B.subtilis AN5	G...T	AC	C-G
B.anthraxis AIMST	AACATT	G.AAT.G	C-G	GT.....T
B.megaterium HPCA4	G.AGGATC.-CTC.TT	GAG.TGAT.G	A..T..C-GT
B.megaterium WAS6-3	GAGATC.-CTC.TT	GAG.TGAT.G	A..T..C-GT
R.prowazekii Rp22	T..AT.CTC.-	C.....GG.....A.-	T..T.G..G.T

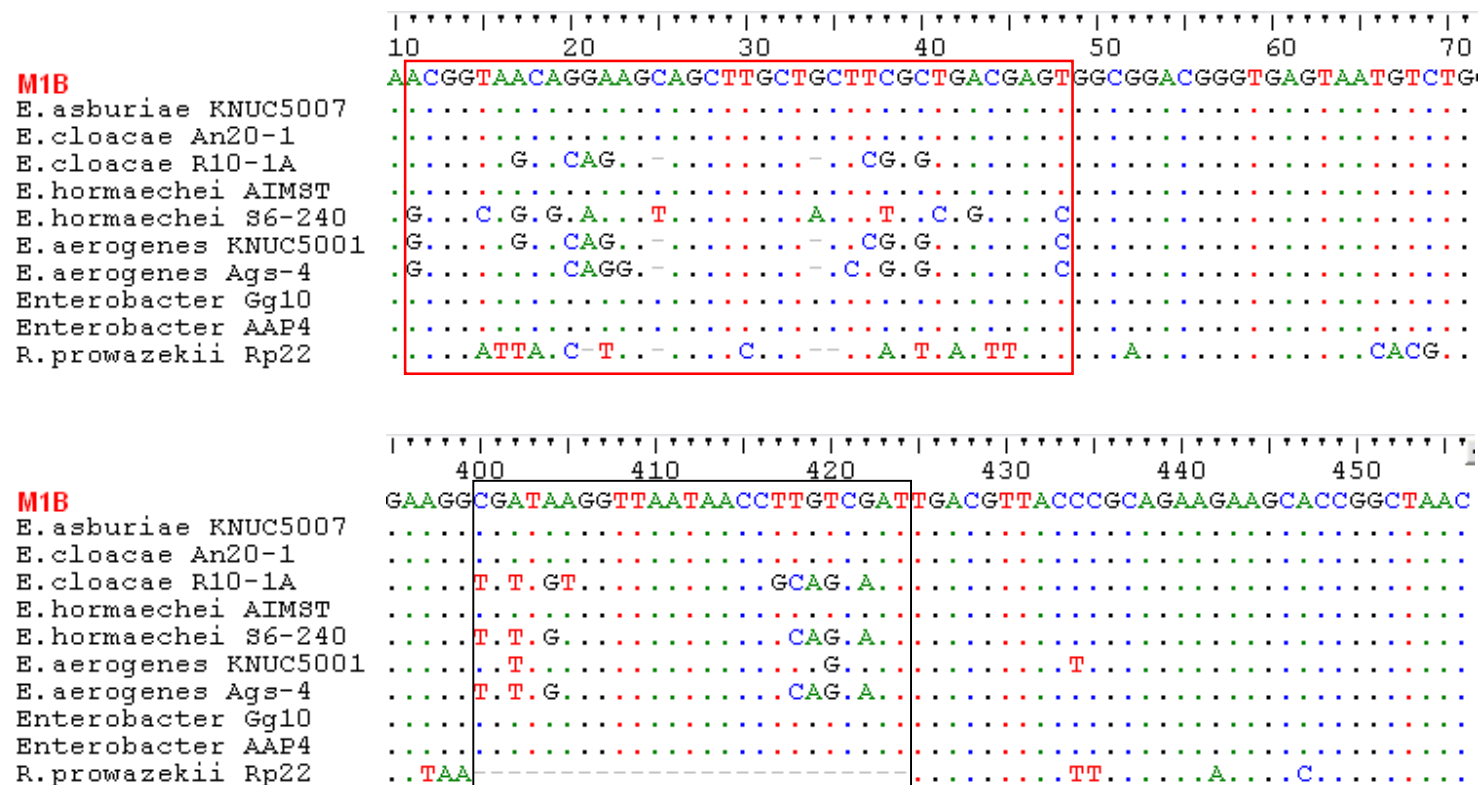
Continúa

Continuación Anexo 1



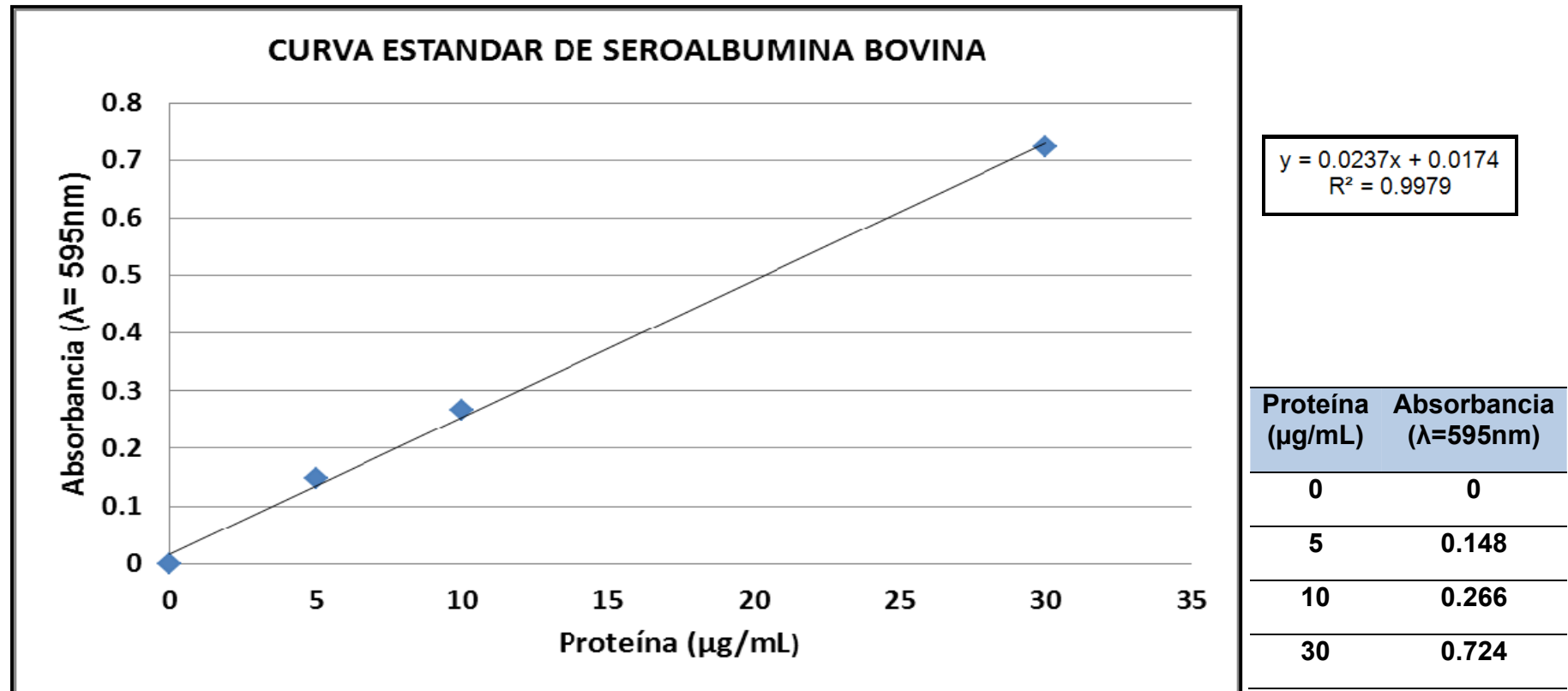
Alineamiento múltiple realizado con el programa ClustalW incluido en el programa BioEdit versión 7.0.9. Se muestra la región más polimórfica (en rojo) que diferencian al grupo *Bacillus licheniformis* y *B. subtilis* del grupo conformado por *B. anthracis* y *B. megaterium*, la región más polimórfica (en verde) que diferencia a *B. licheniformis* y la posición 453 (en negro) que diferencia a la cepa J8A2.

ANEXO 2. ALINEAMIENTO DEL GEN rRNA 16S de M1B

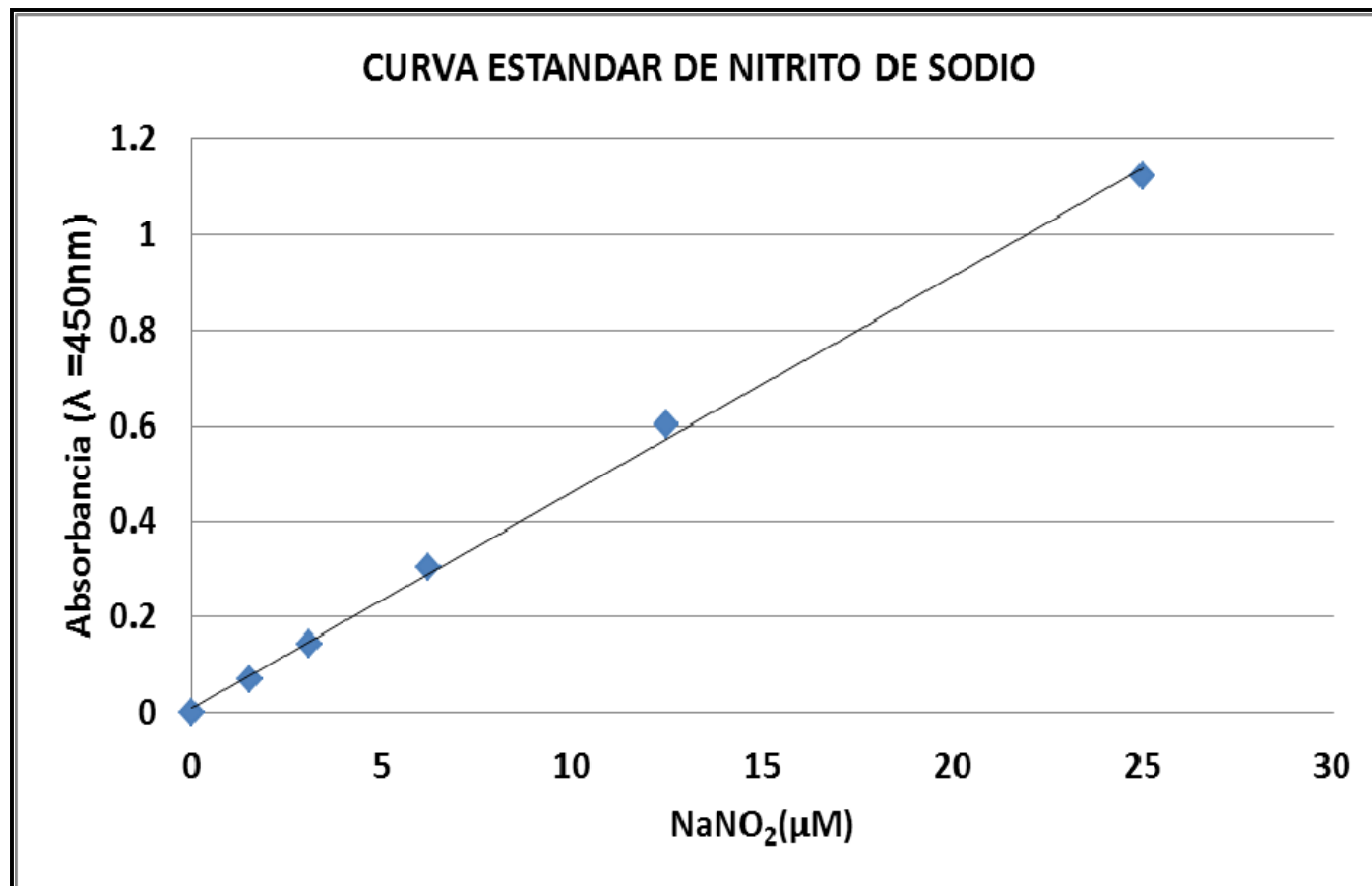


Alineamiento múltiple realizado con el programa ClustalW incluido en el programa BioEdit versión 7.0.9. Se muestran las regiones más polimórficas (en rojo) y la región con más *gaps* (en negro) que diferencia a *Rickettsia.prowazekii* como grupo externo

ANEXO 3. CURVA ESTÁNDAR DE SEROALBUMINA BOVINA



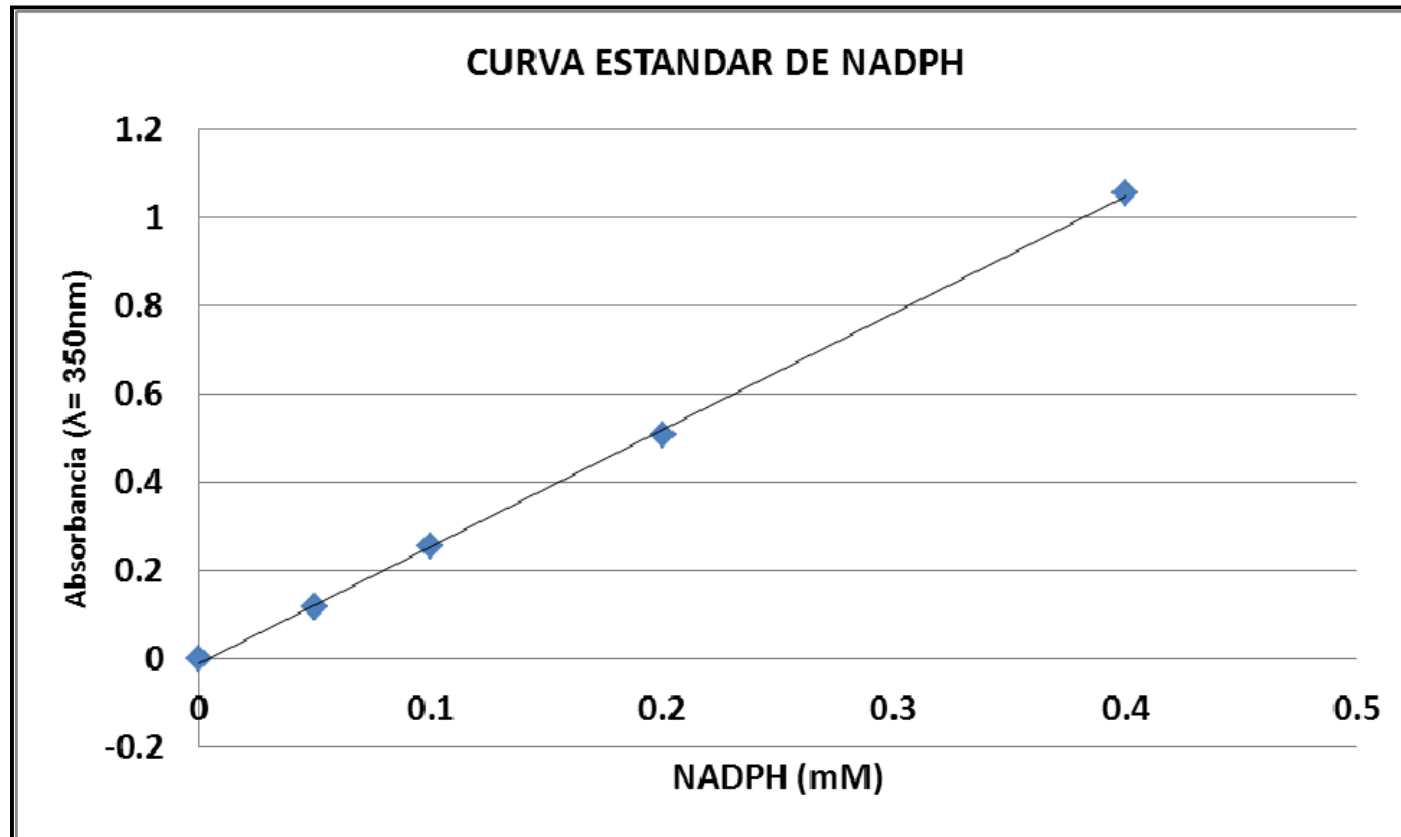
ANEXO 4. CURVA ESTÁNDAR DE NITRITO DE SODIO



$$y = 0.045x + 0.0101$$
$$R^2 = 0.9984$$

NaNO ₂ (μM)	Absorbancia (λ=450nm)
0	0
1.562	0.071
3.125	0.146
6.25	0.304
12.5	0.601
25	1.12

ANEXO 5. CURVA ESTÁNDAR DE NADPH



$$y = 2.6405x - 0.0089$$
$$R^2 = 0.9995$$

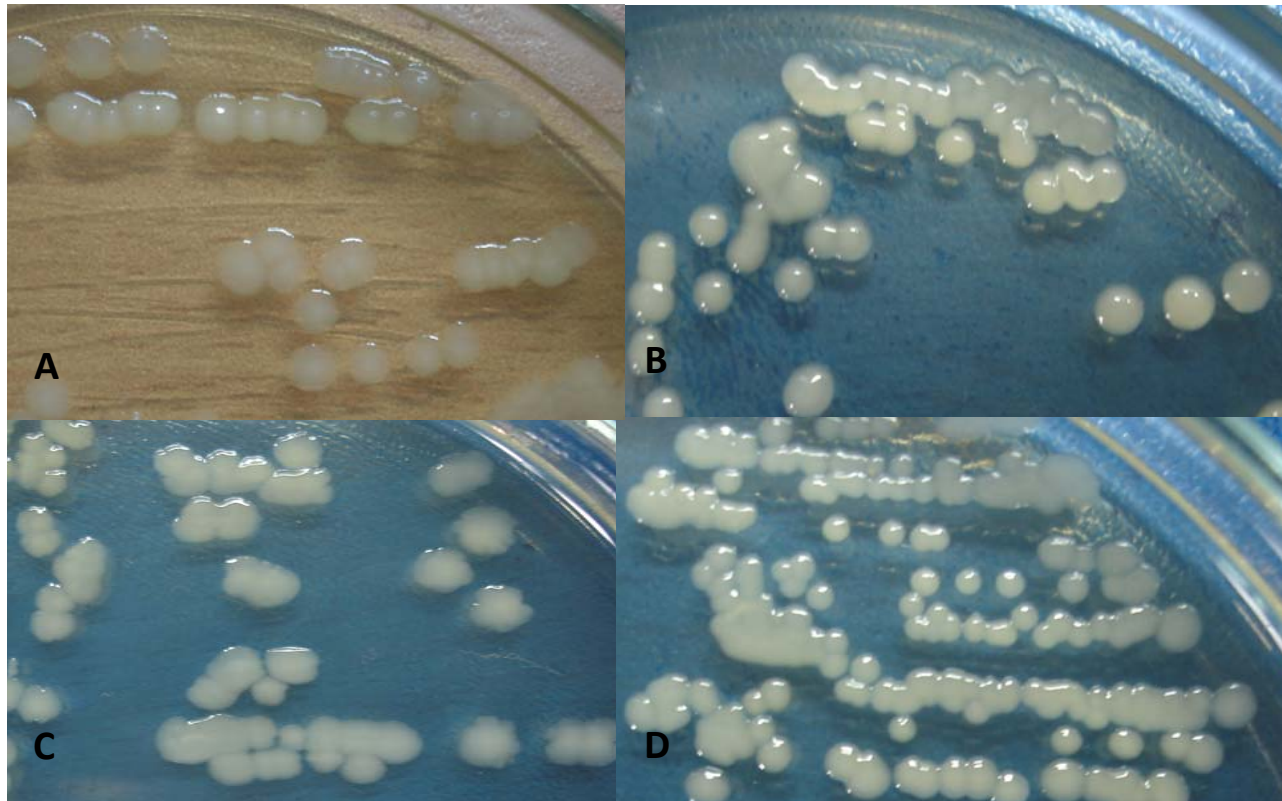
NADPH(mM)	Absorbancia ($\lambda = 350\text{nm}$)
0	0
0.05	0.119
0.1	0.257
0.2	0.506
0.4	1.054

ANEXO 6. COLONIAS DE LAS CEPAS M1B Y J8A2 EN AGAR MINIMO P



Comportamiento cultural en agar mínimo P. En **A**, la cepa M1B y en **B**, la cepa J8A2, incubadas por 24 horas a 28°C.

ANEXO 7. COLONIAS DE LAS CEPAS J8A2 Y M1B EN AGAR TSA



Comportamiento cultural en agar TSA de la cepa J8A2 incubadas por 24 horas a 28 °C en **A**, **B** y **C** que muestran la variabilidad cultural de esta cepa. **A**. bordes irregulares, plana y translúcida; **B**. bordes regulares, convexa y opaca; **C**. bordes irregulares, plana, translúcida y mucoide. Comportamiento cultural de la cepa M1B incubado en TSA por 24 horas a 28 °C en **D**. presenta colonias convexas, bordes regulares y translúcidas.